

**UJI TOKSISITAS BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso
Lavallee) DENGAN METODE EKSTRAKSI ULTRASONIK
BERDASARKAN VARIASI PELARUT TERHADAP LARVA UDANG
Artemia salina Leach**

SKRIPSI

**Oleh:
ANGGIE PRABUANA WIJAYA
NIM. 16630064**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**UJI TOKSISITAS BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso
Lavallee) DENGAN METODE EKSTRAKSI ULTRASONIK
BERDASARKAN VARIASI PELARUT TERHADAP LARVA UDANG
Artemia salina Leach**

SKRIPSI

**Oleh:
ANGGIE PRABUANA WIJAYA
NIM. 16630064**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**UJI TOKSISITAS BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso
Lavallee) DENGAN METODE EKSTRAKSI ULTRASONIK
BERDASARKAN VARIASI PELARUT TERHADAP LARVA UDANG
Artemia salina Leach**

SKRIPSI

**Oleh:
ANGGIE PRABUANA WIJAYA
NIM. 16630064**

Telah diperiksa dan disetujui oleh:

Pembimbing I



**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

Pembimbing II



**Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc
NIDT. 19900906 20180201 2 239**

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**



**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

**UJI TOKSISITAS BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso
Lavallee) DENGAN METODE EKSTRAKSI ULTRASONIK
BERDASARKAN VARIASI PELARUT TERHADAP LARVA UDANG
Artemia salina Leach**

SKRIPSI

**Oleh:
ANGGIE PRABUANA WIJAYA
NIM. 16630064**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 29 Juni 2021**

Penguji Utama	: Eny Yulianti, M.Si NIP. 19760611 200501 2 006	 (.....)
Ketua Penguji	: Dewi Yuliani, M.Si NIDT. 19880711 20160801 2 067	 (.....)
Sekretaris Penguji	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	 (.....)
Anggota Penguji	: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc NIDT. 19900906 20180201 2 239	 (.....)

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**

**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Anggie Prabuana Wijaya

NIM : 16630064

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Toksisitas Ekstrak Ultrasonik Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik Berdasarkan Variasi Pelarut terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 29 Juni 2021

Yang membuat pernyataan,



Anggie Prabuana Wijaya
NIM. 16630064

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah yang telah memberikan rahmat dan nikmat berupa iman, kesehatan, kesempatan, kekuatan, keinginan, serta kesabaran, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian ini. Tidak lupa, Sholawat serta salam penulis panjatkan kepada Rasulullah Muhammad saw. Laporan penelitian yang telah penulis susun ini berjudul **“Uji Toksisitas Ekstrak Ultrasonik Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik Berdasarkan Variasi Pelarut terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach”**.

Penulis menyadari bahwa penulisan laporan penelitian ini tidak akan tersusun dengan baik tanpa adanya bantuan dari pihak-pihak yang terkait. Oleh karena itu, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam penyusunan penulisan laporan penelitian ini. Selanjutnya kami ucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak, Ibu, kakak dan keluarga yang selalu mendoakan serta memberi dukungan yang berharga.
2. Prof. Dr. Abdul Harris selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Dr. Sri Harini, M. Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Elok Kamilah Hayati, M. Si selaku Dosen Pembimbing dan Ketua Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
5. Lulu’atul Hamidatu Ulya, M.Sc selaku Dosen Pembimbing Agama Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

6. Segenap teman-teman Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah membantu penyusunan laporan penelitian ini baik dari segi dukungan, ide, dan waktu.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan laporan penelitian ini, baik dari segi Bahasa maupun pembahasan. Demi kesempurnaan laporan penelitian ini, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga susunan laporan penelitian ini dapat dilaksanakan dan memberi manfaat kepada banyak orang.

Malang, 29 Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR PERSAMAAN.....	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
مستخلص البحث.....	xv

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.4. Batasan Masalah	6
1.5. Manfaat Penelitian.....	7

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Obat dalam Prespektif Islam.....	8
2.2. Anggur Bali	9
2.3. Kandungan dan Manfaat Biji Anggur	11
2.4. Proantosianidin	12
2.5. Ekstraksi Senyawa Aktif Menggunakan Metode Ultrasonik	14
2.6. Kromatografi Lapis Tipis	16
2.7. Spektrofotometer UV-Vis.....	18
2.8. Identifikasi FTIR Proantosianidin	20
2.9. Uji Toksisitas Ekstrak dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	22

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan.....	26
3.2. Alat dan Bahan	26
3.2.1. Alat.....	26
3.2.2. Bahan.....	26
3.3. Tahapan Penelitian	27
3.4. Cara Kerja.....	27
3.4.1. Preparasi Sampel.....	27
3.4.2. Analisis Kadar Air.....	28
3.4.3. Ekstraksi Senyawa Aktif Biji Anggur dengan Metode Ultrasonik	28
3.4.4. Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)	29

3.4.5. Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP).....	29
3.4.6. Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis	30
3.4.7. Identifikasi dengan FTIR	30
3.4.8. Uji Toksisitas Ekstrak Biji Anggur Bali terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	31
3.4.8.1. Penetasan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	31
3.4.8.2. Uji Toksisitas Ekstrak Biji Anggur Bali.....	31
3.4.8.3. Analisis Data.....	32

BAB IV PEMBAHASAN

4.1. Preparasi Sampel	33
4.2. Ekstraksi Ultrasonik Biji Anggur Bali.....	33
4.3. Pemanfaatan Biji Anggur Bali dalam Prespektif Islam.....	35

BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan.....	39
5.2. Saran	39

DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan Penelitian	47
Lampiran 2. Skema Kerja	48
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Anggur bali	10
Gambar 2.2.	Struktur dasar proantosianidin	13
Gambar 2.3.	Proantosianidin tipe A dan proantosianidin tipe B	14
Gambar 2.4.	Visualisasi reagen vanillin-HCl senyawa proantosianidin B2 pada plat KLT beberapa sampel produk ekstrak biji anggur.....	17
Gambar 2.5.	Pola pemisahan KLT ekstrak biji anggur bali dengan pelarut metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1)	18
Gambar 2.6.	Reaksi butanol-HCl dengan proantosianidin	19
Gambar 2.7.	Spektra serapan UV-Vis proantosianidin reaksi butanol-HCl dari hasil fraksi etanol 75% (A dan B) dan fraksi aseton 75% (C dan D) sampel biji anggur liar	20
Gambar 2.8.	Spektra FTIR proantosianidin apel gajah (<i>Dillenia indica</i> Linn.).	22
Gambar 2.9.	Larva <i>Artemia salina</i> Leach fase nauplii	23

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Manfaat ekstrak biji anggur	11
Tabel 2.2.	Parameter nilai LC_{50} aktivitas toksisitas ekstrak.....	24
Tabel 2.3.	Kategori toksisitas ekstrak	24

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 2.1. Penentuan nilai R_F	16
Persamaan 2.2. Hukum Lambert-Beer	18
Persamaan 3.1. Perhitungan kadar air	28
Persamaan 3.2. Perhitungan %Rendemen.....	29
Persamaan 3.3. Perhitungan %Mortalitas	32
Persamaan 3.4. Perhitungan mortalitas	32

ABSTRAK

Wijaya, A. P. 2020. Uji Toksisitas Ekstrak Ultrasonik Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik Berdasarkan Variasi Pelarut terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc.

Kata-kata kunci: biji anggur, proantosianidin, ekstraksi ultrasonik, UV-Vis, FTIR, *Artemia salina* Leach

Biji anggur yang dinilai sebagai produk limbah industri anggur dapat berpotensi sebagai obat. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa biji anggur memiliki aktivitas sebagai obat seperti anti-diabetes, antioksidan, anti-kolesterol, anti-inflamasi, anti-penuaan, antibakteri, dan anti-tumor. Biji anggur memiliki banyak manfaat disebabkan kandungan senyawa kimia aktif yang terdapat di dalamnya, salah satunya adalah proantosianidin.

Pada penelitian ini digunakan biji anggur bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan proses ekstraksi menggunakan metode ultrasonik selama 20 menit pada frekuensi 20 kHz. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas ekstrak biji anggur bali berdasarkan variasi pelarut metanol: air: HCl (70:29:1) (MAH), aseton: air: asam asetat (70:29,5:0,5) (AAA) dan metanol: air: asam asetat (70:29,9:0,1) (MAA). Penelitian ini juga bertujuan untuk membuktikan kebenaran isolat KLTP di R_F 0,42 dari ekstrak MAA yang diduga senyawa proantosianidin. Ketiga ekstrak tersebut diuji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* L. Kemudian, ketiga ekstrak dan isolat KLTP diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrofotometer FTIR digunakan untuk menganalisis keberadaan proantosianidin pada isolat KLTP.

Hasil uji toksisitas menunjukkan nilai LC_{50} ekstrak MAH berpotensi sebagai antikanker, sementara kedua ekstrak lainnya berpotensi sebagai antibakteri. Hasil KLTP menghasilkan 1 isolat terduga proantosianidin di R_F 0,42. Hasil spektrum UV-Vis ekstrak MAH, AAA, dan MAA menunjukkan bahwa terdapat kandungan proantosianidin, sementara isolat KLTP tidak memunculkan λ_{maks} sepanjang rentang 400-800 nm. Hasil FTIR isolat KLTP tidak menghasilkan serapan khas proantosianidin pada daerah 1520-1540 cm^{-1} dan 730-780 cm^{-1} . Isolat pada R_F 0,42 diduga tidak mengandung senyawa proantosianidin.

ABSTRACT

Wijaya, A. P. 2020. **Toxicity Test of Ultrasonic Extract of Bali Grape Seed (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) with Ultrasonic Extraction Method Based on Solvent Variations on *Artemia salina* Leach.** Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Supervisor I: Elok Kamilah Hayati, M.Sc; Supervisor II: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc.

Key words: *grape seed, proanthocyanidins, ultrasonic extraction, UV-Vis, FTIR, Artemia salina*

Grape seeds, which are considered a waste product of the wine industry, have medicinal potential. Several studies have shown that grape seed has medicinal activities such as anti-diabetic, antioxidant, anti-cholesterol, anti-inflammatory, anti-aging, antibacterial, and anti-tumor. Grape seeds have many benefits due to the active chemical compounds contained in them, one of which is proanthocyanidin compounds.

In this study, bali grape seeds (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) were used with the extraction process using the ultrasonic method at frequency of 20 kHz for 20 minutes. This study aims to determine the toxicity level of bali grape seed extract based on variations in solvents of methanol: water: HCl (70:29:1) (MAH), acetone: water: acetic acid (70:29.5:0.5) (AAA) and methanol: water: acetic acid (70:29.9:0.1) (MAA). This study also aims to prove the correctness of Preparative TLC (PTLC) isolates at R_F 0.42 from MAA extract which is suspected to be a proanthocyanidin compound. The three extracts were tested for toxicity against *Artemia salina* L larvae. Then, the three extracts and isolates of PTLC were tested using a UV-Vis spectrophotometer. FTIR spectrophotometer was used to analyze the presence of proanthocyanidins in PLTC isolates.

The toxicity test showed that the LC_{50} value of the MAH extract has the potential as anticancer, while the other two extracts have the potential as antibacterial. PTLC resulted in 1 isolate of suspected proanthocyanidin at an R_F of 0.42. UV-Vis spectrum results of MAH, AAA, and MAA extract indicated that there was proanthocyanidin content, while PTLC isolates did not show λ_{max} in the 400-800 nm range. The FTIR results of PTLC isolates did not produce a typical proanthocyanidin uptake in the 1520-1540 cm^{-1} and 730-780 cm^{-1} regions. The isolate at R_F 0.42 was suspected not contain proanthocyanidin compounds.

مستخلص البحث

وبجايا ، أ. ف ٢٠٢٠ . اختبار السمية للمستخلص بالموجات فوق الصوتية لبذور عنب بالي (*Vitis vinifera L. Var. Alphonso Lavallee*) باستخدام طريقة الاستخراج بالموجات فوق الصوتية بناءً على اختلافات المذيبات في يرقات روبيان ارتيميا ساليينا ليتش. البحث العلمي. قسم الكيمياء ، كلية العلوم و التكنولوجيا ، جامعة مولانا مالك ابراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: إيلوك كاملة حياقي الماجستير ، المشرفة الثانية: لؤلؤة الحميدة عليا الماجستير.

الكلمات المفتاحية: بذور العنب ، بروانتوسيانيدين ، الاستخراج بالموجات فوق الصوتية ، فوق بنفسجي مرئي (*UV-Vis*) ، جهاز فورييه لتحويل طيف الأشعة تحت الحمراء (*FTIR*) ، ارتيميا ساليينا ليتش

تعتبر بذور العنب من نفايات صناعة النبيذ و لها إمكانات كدواء. أظهرت العديد من الدراسات أن بذور العنب لها أنشطة طبية مثل مضادات السكر و مضادات الأكسدة و مضادات الكوليسترول و مضادة للالتهابات و مضادة للشيخوخة و مضادة للبكتيريا و مضادة للأورام. لبذور العنب العديد من الفوائد بسبب المركبات الكيميائية النشطة الموجودة فيها ، أحدها البروانثوسيانيدين.

في هذه الدراسة تم استخدام بذور عنب بالي (*Vitis vinifera L. Var. Alphonso Lavallee*) مع عملية الاستخلاص باستخدام طريقة الموجات فوق الصوتية لمدة ٢٠ دقيقة بتردد ٢٠ كيلو هرتز. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد مستوى السمية لمستخلص بذور العنب بالي بناءً على الاختلافات في مذيبات الميثانول: الماء: حمض الهيدروكلوريك (٧٠: ٢٩: ١) (*MAH*) ، الأسيتون: الماء: حمض الأسيتيك (٧٠: ٢٩,٥: ٠,٥) (*AAA*) والميثانول: الماء: حمض الخليك (٧٠: ٢٩,٩: ٠,١) (*MAA*). تهدف هذه الدراسة أيضًا إلى إثبات صحة عزلات كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (*KLTP*) عند R_F ٠,٤٢ من مستخلصات *MAA* المشتبه في أنها مركبات بروانتوسيانيدين. تم اختبار سمية المستخلصات الثلاثة ضد يرقات الجمبري ارتيميا ساليينا ليتش. ثم تم اختبار المستخلصات الثلاثة و عزلات كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (*KLTP*) باستخدام مقياس الطيف الضوئي فوق بنفسجي مرئي (*UV-Vis*). تم استخدام مقياس الطيف الضوئي جهاز فورييه لتحويل طيف الأشعة تحت الحمراء (*FTIR*) لتحليل وجود بروانتوسيانيدين في عزلات كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (*KLTP*).

أظهرت نتائج اختبار السمية أن قيمة LC_{50} لمستخلص *MAH* كانت ١٥,٦٧٣ جزء في المليون ، و قيمة LC_{50} لمستخلص *AAA* كانت ٥٥,٠١٠ جزء في المليون ، و قيمة LC_{50} لمستخلص *MAA* كانت ٨٤,٢٣٥ جزء في المليون. تشير قيمة LC_{50} إلى أن مستخلص *MAH* لديه القدرة على أن يكون مضادًا للسرطان ، في حين أن المستخلصين الآخرين لهما القدرة على العمل كمضاد للبكتيريا. أسفرت نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (*KLTP*) عن عزل واحد من البروانثوسيانيدين المشتبه به عند R_F ٠,٤٢ . أعطت أطباق فوق بنفسجي مرئي (*UV-Vis*) لمستخلصات *MAH* و *AAA* و *MAA* لبذور عنب بالي الحد الأقصى بالتتابع عند ٥٤٨ نانومتر ؛ ٥٤٩.٩ نانومتر ؛ و ٥٤٩ نانومتر مما يشير إلى وجود محتوى من البروانثوسيانيدين ، بينما لم تظهر عزلات كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (*KLTP*) الحد الأقصى في النطاق ٨٠٠-٤٠٠ نانومتر. نتائج جهاز فورييه لتحويل طيف الأشعة تحت الحمراء (*FTIR*) لعزلات كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (*KLTP*) لم تنتج امتصاص بروانتوسيانيدين نموذجي في مناطق ١٥٤٠-١٥٢٠ سم^{-١} و ٧٣٠-٧٨٠ سم^{-١} لم يُشتبه في أن تكون العزلة عند R_F ٠,٤٢ عبارة عن بروانتوسيانيدين.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sekitar 10-12 kg limbah biji anggur dalam 100 kg residu basah dihasilkan dari industri minuman anggur. Biji anggur yang dinilai sebagai produk limbah ternyata masih banyak mengandung senyawa-senyawa kimia di dalamnya. Biji anggur mengandung 40% serat, 16% minyak, 11% protein, dan 7% fenol kompleks. Biji anggur kaya akan senyawa fenolik seperti flavonoid dan mengandung monomer, dimer, trimers, oligomer, dan polimer (Ma dan Zhang, 2017). Kandungan polifenol dalam biji anggur yaitu flavonoid, asam galat, monomer flavan-3-ol seperti katekin, epikatekin, gallokatekin, epigalokatekin dan epikatekin 3-O-galat, dan prosianidin dalam bentuk dimer, trimer dan lebih banyak prosianidin terpolimerisasi (Shi *et al.*, 2003).

Ekstrak biji anggur telah menjadi semakin populer di pasaran sebagai suplemen nutrisi terutama di Australia, Korea, Jepang dan Amerika Serikat. Ekstrak biji anggur memiliki manfaat kesehatan seperti anti-diabetes, antioksidan, anti-kolesterol, anti-peradangan, anti-penuaan, antimikroba, dan anti-tumor. Manfaat kesehatan tersebut banyak dikaitkan dengan adanya kandungan senyawa proantosianidin yang terdapat dalam biji anggur (Ma dan Zhang, 2017).

Ekstrak biji anggur sebagai salah satu bahan alam yang berguna sebagai bahan obat adalah karunia Allah yang patut disyukuri dan dimanfaatkan sebaik-baiknya. Sebagaimana firman Allah dalam surat Taha ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَوَسَّلَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

Artinya: “(Tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu, dan menjadikan jalan-jalan di atasnya bagimu, dan yang menurunkan air (hujan) dari langit.” Kemudian Kami tumbuhkan dengannya (air hujan itu) berjenis-jenis aneka macam tumbuh-tumbuhan.” (Q.S Taha: 53).

Dalam tafsir Al-Misbah oleh Shihab (2001) ayat tersebut memiliki makna bahwa kehidupan dan pemeliharaan merupakan nikmat yang diberikan Allah kepada hamba-hamba-Nya. Bumi yang dijadikan sebagai hamparan untuk manusia, membuka jalan-jalan untuk kamu lalu serta menjadikan sungai-sungai dari hujan yang telah Dia turunkan di atas bumi. Tumbuh-tumbuhan yang berbeda-beda warna, rasa dan manfaatnya Allah tumbuhkan dengan air tersebut. Hal ini memberikan penguatan bahwa manusia dapat mengambil manfaat dari tumbuhan yang diciptakan oleh Allah. Dalam hal ini tumbuhan yang dapat bermanfaat sebagai obat yaitu tanaman anggur.

Anggur bali (*Vitis vinifera* Linn varietas Alphonso Lavallee) dipilih karena besarnya kandungan flavonoid, flavan-3-ol yang merupakan monomer proantosianidin. Penelitian Nile *et al.*, (2013) mendapatkan bahwa anggur bali memiliki kandungan flavanoid terbesar dibandingkan anggur dari kelompok varietas hitam lainnya seperti *Flouxa*, *Black Pegaru*, *Concord*, *Campbell Early* dan *Spherper*. Selain itu, anggur bali merupakan anggur lokal yang diunggulkan oleh Departemen Pertanian dan memiliki produksi anggur 15-25 kg/pohon/tahun (Wiryanta, 2008).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengekstraksi biji anggur adalah metode ekstraksi ultrasonik. Metode ultrasonik memiliki keunggulan dalam

hal kecepatan waktu ekstraksi, lebih hemat pelarut, dan randemennya lebih maksimal (Winata dan Yunianta, 2015). Porto *et al.*, (2012) melakukan ekstraksi ultrasonik biji anggur pada 20 kHz, 150 W selama 30 menit memberikan hasil minyak biji anggur mirip dengan ekstraksi *soxhlet* selama 6 jam dengan persentase hasil 96,2%. Samavardhana *et al.*, (2015) menunjukkan bahwa ekstraksi ultrasonik biji anggur mengandung jumlah dari total fenolik dan total flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan teknik maserasi secara urut untuk metode ultrasonik 159,95 mg/g dan 111,81 mg/g dan metode maserasi 151,33 mg/g dan 107,05 mg/g.

Pemilihan pelarut dan waktu ekstraksi merupakan faktor utama dalam mensintesis senyawa flavonoid proantosianidin dalam biji anggur dengan menggunakan metode ultrasonik. Sementara itu, Torres *et al.*, (2017) menyebutkan bahwa pada menit 10-20 waktu ekstraksi ultrasonik total kandungan senyawa fenolik sebesar 90% dapat diperoleh. Penelitian lain oleh Xu *et al.*, (2010) menggunakan metode ultrasonik pada biji anggur menggunakan pelarut metanol: air: HCl (70: 29: 1), aseton: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan etanol: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) menghasilkan ekstrak proantosianidin 69,8 mg/g sampel, 60 mg/g sampel dan 37 mg/g sampel dengan waktu optimal selama 20 menit.

Penentuan senyawa proantosianidin dalam ekstrak biji anggur dapat dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) melalui penyemprotan dengan reagen vanillin-HCl. KLT merupakan metode pemisahan yang sederhana serta prosedur yang relatif cepat dan murah untuk berbagai campuran sampel (Wulandari, 2011). Villani *et al.*, (2015) menganalisis proantosianidin melalui metode KLT dari sampel ekstrak biji anggur menggunakan eluen aseton: asam asetat: toluena (3: 1: 3). Senyawa proantosianidin B2 terlihat

dengan terbentuknya noda merah muda setelah penyemprotan dengan reagen vanillin-HCl pada R_F 0,35. Penelitian sebelumnya oleh Afrianto (2021) menganalisis proantosianidin melalui metode KLT analitik dari sampel ekstrak biji anggur bali dengan pelarut terbaik yaitu metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1) dan didapatkan hasil noda dugaan senyawa proantosianidin terbentuk pada kisaran R_F 0,37-0,45.

Uji toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menjadi bagian utama dalam penelitian ini yang digunakan sebagai tahap pendahuluan untuk mengetahui potensi ekstrak biji anggur bali sebagai obat. Uji toksisitas digunakan untuk mengetahui kemampuan ekstrak yang dapat menimbulkan kerusakan ketika masuk kedalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya (Soemirat, 2005). Kelebihan metode ini yaitu lebih cepat, murah, mudah, tidak memerlukan kondisi aseptis dan dapat dipercaya (Meyer *et al.*, 1982).

Suatu senyawa yang memiliki nilai LC_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ dikatakan sebagai senyawa toksik terhadap *Artemia salina* Leach (Meyer *et al.*, 1982). Beberapa penelitian memberikan hasil bahwa nilai toksisitas dari bagian biji anggur lebih besar daripada nilai toksisitas dari bagian buah anggur. Penelitian Mutia (2010) melakukan uji toksisitas akut ekstrak etanol buah anggur menggunakan metode BSLT menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 648.004 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian lain oleh Atolani *et al.*, 2012 menguji toksisitas dari ekstrak soxhlet biji anggur lokal menggunakan metode BSLT menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 12,76 $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan penjelasan yang telah dipaparkan di atas terdapat kemungkinan bahwa biji anggur bali memiliki potensi sebagai obat. Penelitian ini

dilakukan untuk menguji tingkat toksisitas dari ekstrak biji anggur bali (*V. vinifera* L. var. Alphonso Lavallee) dari hasil ekstraksi ultrasonik menggunakan metode BSLT sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui potensi biji anggur bali sebagai obat. Selain itu, penelitian ini juga dilakukan untuk membuktikan kebenaran dari hasil noda KLT yang diduga senyawa proantosianidin dari penelitian sebelumnya oleh Afrianto (2021) dengan pelarut terbaik metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1).

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil toksisitas ekstrak biji anggur bali (*V. vinifera* L. var. Alphonso Lavallee) dengan pelarut metanol: air: HCl (70: 29: 1), aseton: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1) terhadap larva udang?
2. Bagaimana hasil identifikasi adanya senyawa proantosianidin pada ekstrak biji anggur bali dengan pelarut metanol: air: HCl (70: 29: 1), aseton: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1) menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis?
3. Bagaimana hasil identifikasi dugaan senyawa proantosianidin hasil isolat KLTP ekstrak biji anggur bali dengan pelarut metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1) menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis dan FTIR?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui tingkat toksisitas ekstrak biji anggur bali (*V. vinifera* L. var. Alphonso Lavallee) dengan pelarut metanol: air: HCl (70: 29: 1), aseton: air:

asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1) terhadap larva udang.

2. Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa proantosianidin pada ekstrak biji anggur bali dengan pelarut metanol: air: HCl (70: 29: 1), aseton: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1) menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis.
3. Untuk mengetahui hasil identifikasi noda dugaan senyawa proantosianidin pada hasil isolat KLTP ekstrak biji anggur bali dengan pelarut metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1) menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

1.4. Batasan Masalah

1. Sampel uji yang digunakan yaitu biji anggur bali (*V. vinifera* L. var. Alphonso Lavallee).
2. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode ultrasonik pada frekuensi 20 kHz selama 20 menit.
3. Pelarut yang digunakan yaitu metanol: air: HCl (70: 29: 1), aseton: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1).
4. Analisis proantosianidin melalui metode KLTP menggunakan plat silika gel F₂₅₄ dengan eluen aseton: asam asetat: toluena (3: 1: 3).
5. Instrumentasi yang digunakan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa proantosianidin yaitu spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm dan FTIR.
6. Metode uji toksisitas yang digunakan yaitu BSLT.

7. Larva udang yang digunakan yaitu larva udang *Artemia salina* Leach dari merek Supreme Plus.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai ekstrak biji anggur bali (*V. vinifera* L. var. Alphonso Lavallee) yang berpotensi sebagai obat. Penelitian ini juga diharapkan dapat dilanjutkan dengan klinis sehingga dapat dijadikan pilihan terapi dalam berbagai macam pengobatan tertentu.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Obat dalam Perspektif Islam

Allah menciptakan alam dan isinya seperti tumbuhan dan hewan dengan hikmah yang amat besar. Tidak ada satupun hal yang Allah ciptakan dengan sia-sia. Dalam hal ini, manusia diberi kesempatan seluas-luasnya untuk mengambil manfaat dari hewan dan tumbuhan tersebut. Sekecil apapun ciptaan Allah memiliki nilai guna, hanya orang kafirlah yang memandang remeh ciptaan Allah. Sebagaimana firman Allah dalam surat Sad ayat 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ﴿٢٧﴾

Artinya: *“Dan Kami tidak akan menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, Maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.” (Q.S Sad: 27).*

Dalam tafsir Al-Misbah oleh Shihab (2001) ayat di atas memiliki makna bahwa Kami tidak menciptakan langit dan bumi beserta semua yang ada di antara keduanya dengan sia-sia. Itu hanya sangkaan orang-orang kafir sehingga mereka semena-mena memberikan keputusan sesuai hawa nafsunya. Adanya langit dan bumi beserta isinya ialah hikmah yang agung. Apabila mereka memiliki prasangka buruk terhadap Allah, celakalah mereka. Manusia diberi tanggung jawab untuk menjaga dan memanfaatkan segala ciptaan Allah di dunia.

Alam beserta isinya telah Allah ciptakan manfaatnya yang amat besar, terutama bagi manusia. Salah satunya adalah tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat-obatan. Hal tersebut dapat dijadikan contoh bahwa Allah telah menunjukkan nilai guna pada segala sesuatu yang telah Dia ciptakan. Hal ini terdapat di dalam Al-Quran surat Asy-Syu'ara ayat 7:

﴿وَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik.” (QS. Asy-Syu'ara: 7).

Dalam tafsir Al-Misbah oleh Shihab (2001) ayat tersebut memiliki makna bahwa Allah yang mengeluarkan dari bumi ini beraneka ragam tumbuh-tumbuhan yang mendatangkan manfaat. Hal ini hanya dapat dilakukan oleh Tuhan yang Maha Esa dan Maha Kuasa. Sebenarnya, jika mereka bersedia merenungi dan mengamati hal itu, niscaya mereka akan mendapatkan petunjuk. Oleh karena itu, manusia senantiasa dapat mengambil manfaat dari tumbuhan yang diciptakan oleh Allah. Allah menganugerahkan bermacam-macam jenis tumbuhan agar dapat dipelajari dan dimanfaatkan. Tumbuhan-tumbuhan tersebut dapat dipilih dan digunakan sebagai obat dari berbagai atau sebagian penyakit. Salah satu tumbuhan tersebut yaitu anggur dimana bagian bijinya dapat dimanfaatkan sebagai obat.

2.2. Anggur Bali

Anggur bali (*Vitis vinifera* Linn varietas Alphonse Lavallee) merupakan yang banyak dikembangkan sejak tahun 1974 di Buleleng, Singaraja. Anggur bali

termasuk produk anggur lokal yang diunggulkan oleh Departemen Pertanian. Produksi anggur bali sebesar 15-25 kg/pohon/tahun (Wiryanta, 2008). Buah anggur bali dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Anggur bali

Anggur bali memiliki buah dengan warna hitam keunguan jika matang dan tergolong ke dalam varietas anggur hitam (Astawa, dkk., 2015). Buah berwarna hijau tua hingga ungu kehitaman, berbentuk bulat sampai bulat telur, berkulit halus dan tertutup bedak tebal. Tanaman anggur bali memiliki bentuk bunga kecil, sempurna, dalam tandan dengan warna bunga putih kekuningan (Rukmana, 1999).

Hasil penelitian Nile *et al.*, (2013) mendapatkan bahwa buah anggur bali memiliki kandungan flavonoid yang lebih banyak dibandingkan buah anggur dari kelompok varietas hitam lainnya seperti *Flouxa*, *Black Pegaru*, *Concord*, *Campbell Early* dan *Spherper* yaitu sebesar 38 mg/g. Klasifikasi anggur bali adalah sebagai berikut (Rukmana, 1999):

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Magnoliphyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Rhamnales

Famili : Vitaceae
 Genus : Vitis
 Spesies : *Vitis vinifera* Linn var. Alphonso Lavallo

2.3. Kandungan dan Manfaat Biji Anggur

Anggur merupakan buah yang paling banyak ditanam dan total produksi anggur di seluruh dunia yaitu sekitar 60 juta ton dan tergolong sebagai produk sampingan industri anggur (Ma dan Zhang, 2017). Biji anggur mengandung 40% serat, 16% minyak, 11% protein, dan 7% fenol kompleks. Kandungan polifenol dalam biji anggur kebanyakan adalah flavonoid, asam galat, monomer flavan-3-ol seperti katekin, epikatekin, gallokatekin, epigalokatekin dan epikatekin 3-O-galat, dan prosianidin dalam bentuk dimer, trimer dan polimer prosianidin. Kandungan utama biji anggur adalah fenol seperti proantosianidin (proantosianidin oligomerik) (Shi *et al.*, 2003). Beberapa manfaat dari ekstrak biji anggur dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Manfaat ekstrak biji anggur

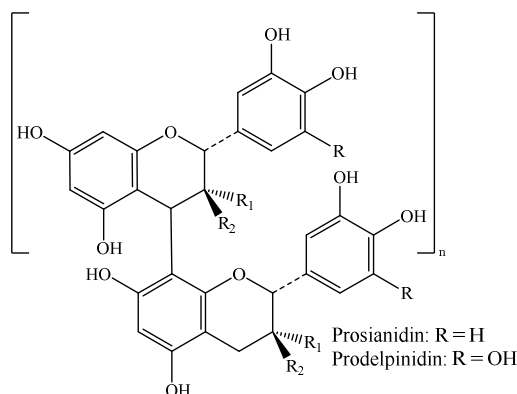
Manfaat Kesehatan	Hasil	Sumber
Anti-diabetes	Ekstrak prosianidin biji anggur berinteraksi dengan reseptor insulin dan menginduksi autofosforilasi reseptor insulin untuk merangsang pengambilan glukosa	Montagut <i>et al.</i> , (2010)
Antioksidan	Kapasitas antioksidan tertinggi ada pada biji anggur (281 μ M Trolox ekuivalen kapasitas antioksidan (TEAC/g) diikuti oleh daun (236 μ M TEAC/g), kulit (13 μ M TEAC/g), dan pulp (2,4 μ M TEAC/g)	Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> , (2003)
Anti-kolesterol	Ekstrak biji anggur mengurangi stres oksidatif postprandial dengan meningkatkan konsentrasi antioksidan plasma dan mencegah peningkatan hidroperoksida lipid. Hal ini meningkatkan ketahanan terhadap modifikasi oksidatif kolesterol LDL. Polifenol dalam ekstrak biji anggur mengaktifkan serum <i>paraoxonase</i>	Natella <i>et al.</i> , (2002)

	(PON) yang mencegah peningkatan peroksida lipid postprandial	
Anti-inflamasi	Ekstrak prosianidin biji anggur berkaitan dengan penurunan ekspresi modul faktor pertumbuhan epidermal yang mengandung reseptor mirip musin 1 (EMR1) (penanda spesifik makrofag F4/80) dan menunjukkan infiltrasi makrofag yang berkurang dari jaringan adiposa putih sehingga dapat membantu mencegah penyakit terkait inflamasi tingkat rendah pada obesitas	Terra <i>et al.</i> , (2011)
Anti-penuaan	Ekstrak biji anggur dapat menghambat akumulasi produk kerusakan DNA oksidatif terkait usia seperti <i>8-hydroxy-20-deoxyguanosine</i> (8-OHdG) dan ikatan silang protein DNA di sumsum tulang belakang dan di berbagai daerah otak termasuk striatum, korteks serebral, dan hipokampus	Balu <i>et al.</i> , (2006)
Antibakteri	Ekstrak biji anggur menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap <i>Micrococcus luteus</i> ATCC®9341, <i>S. aureus</i> ATCC®29213, <i>E. coli</i> ATCC®25992, <i>P. aeruginosa</i> ATCC®27853, <i>Aspergillus niger</i> , dan <i>Fusarium oxysporum</i> , dengan diameter zona pertumbuhan penghambatan berkisar antara 15-20 mm	Ghouila <i>et al.</i> , (2017)
Anti-tumor	Penggunaan antioksidan biji anggur memiliki potensi dalam melawan berbagai sel kanker dengan menargetkan reseptor faktor pertumbuhan epidermal dan jalur hilirnya. Antioksidan biji anggur dapat menghambat ekspresi berlebih dari reseptor COX-2 dan prostaglandin E2, atau memodifikasi jalur reseptor estrogen, menghasilkan sel siklus penangkapan dan apoptosis	Zhou dan Raffoul, 2012

2.4. Proantosianidin

Proantosianidin oligomer merupakan konstituen utama dalam biji anggur dan terdapat sebanyak 92-95% (Fiume *et al.*, 2014). Proantosianidin disebut juga tanin terkondensasi adalah oligomer atau polimer flavan-3-ol yang dihubungkan melalui ikatan karbon interflavan (Dai dan Mumper, 2010). Proantosianidin terdapat dalam bentuk monomer, dimer, trimer, dan oligomer sebesar 20 unit atau

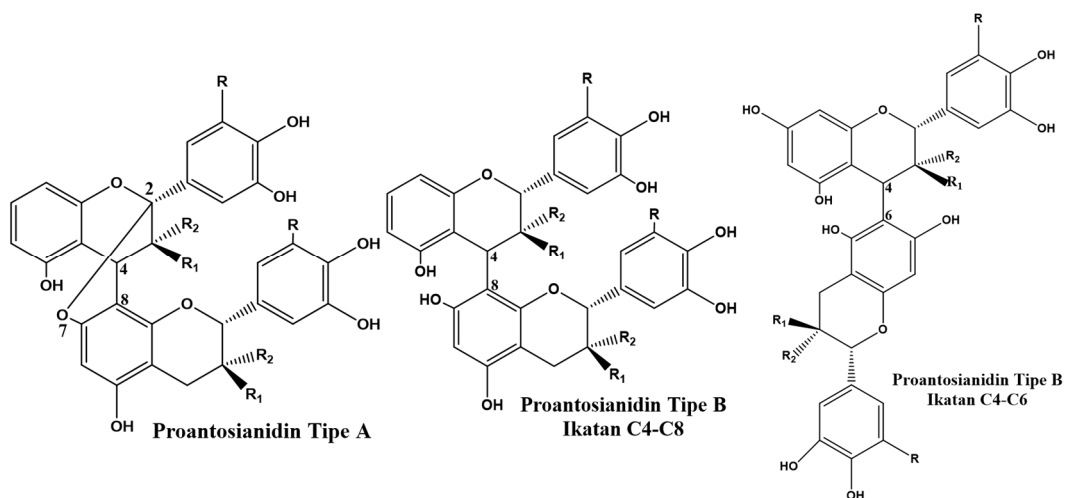
lebih. Berbagai bentuk senyawa ini memungkinkan sebagian besar dari mereka larut dalam air, meskipun tanin terkondensasi yang lebih besar ternyata tidak larut (Liu dan White, 2012). Struktur dasar dari proantosianidin dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Struktur dasar proantosianidin (Dai dan Mumper, 2010)

Semua flavonoid didasarkan pada kerangka difenilpropana C6-C3-C6 yang khas. Monomer flavan-3-ol utama dalam anggur mengandung katekin, epikatekin, dan epikatekin 3-galat, epigalokatekin, dan galokatekin. Tanin terkondensasi memiliki struktur kimia flavanol yang kompleks. Mereka dapat mengandung (epi) katekin, (epi) *afzelechin*, dan (epi) galokatekin dan masing-masing dinamakan prosianidin, propelargonidin, dan prodelpinidin (Unusan, 2020).

Proantosianidin tipe B ditunjukkan dengan adanya ikatan tunggal C4-C6 atau C4-C8, sedangkan proantosianidin tipe A ditunjukkan dengan adanya tambahan ikatan C2-O-C7 atau C2-O-C5. Proantosianidin pada anggur kebanyakan adalah tipe-B, dengan ikatan C4-C8 jauh lebih banyak dibandingkan ikatan C4-C6. Struktur proantosianidin tipe A dan B dapat dilihat pada Gambar 2.3 (Unusan, 2020).



Gambar 2.3. Proantosianidin tipe A dan proantosianidin tipe B

2.5. Ekstraksi Senyawa Aktif Menggunakan Metode Ultrasonik

Ekstraksi ultrasonik adalah metode ekstraksi yang melibatkan gaya geser yang diciptakan oleh ledakan gelembung kavitasi pada perambatan gelombang akustik dalam rentang kHz. Meletusnya gelembung menghasilkan efek fisik, kimia dan mekanik, yang mengakibatkan gangguan membran biologis untuk meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam bahan seluler dan meningkatkan transfer massa (Dai dan Mumper, 2010).

Ekstraksi menggunakan ultrasonik menyebabkan degradasi fenolat yang lebih sedikit dan merupakan proses ekstraksi yang jauh lebih cepat dalam ekstraksi senyawa fenolik (Dai dan Mumper, 2010). Metode ekstraksi ultrasonik memiliki beberapa kelebihan lain yaitu dapat mengeluarkan ekstrak dari matriks tanpa merusak struktur senyawa pada ekstrak, penggunaan pada temperatur rendah sehingga mencegah hilangnya atau menguapnya senyawa yang memiliki titik didih rendah (Handaratri dan Yuniati, 2019)

Penelitian oleh Porto *et al.*, (2012) mendapatkan bahwa ekstraksi ultrasonik pada 20 kHz, 150 W selama 30 menit memberikan persentase hasil 96,2% minyak biji anggur mirip dengan ekstraksi *soxhlet* selama 6 jam. Penelitian Samavardhana *et al.*, (2015) menunjukkan bahwa ekstraksi ultrasonik biji anggur dari proses pengolahan jus mengandung jumlah total fenolik dan total flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan metode maserasi yaitu 159,95 mg/g dan 111,81 mg/g untuk ultrasonik dan 151,33 mg/g dan 107,5 mg/g untuk maserasi.

Sebagian besar ekstraksi ultrasonik dilakukan dengan peralatan frekuensi rendah (20-60 kHz), terutama dengan senyawa fenolik bioaktif, karena frekuensi ini tidak mempengaruhi stabilitas mereka setelah diekstraksi. Pada rentang waktu ekstraksi 10-20 menit 90% dari perolehan total kandungan senyawa fenolik dapat dicapai sehingga menunjukkan laju ekstraksi yang sangat cepat (Torres *et al.*, 2017). Unusan (2020) mendapatkan bahwa kandungan monomer proantosianidin (flavan-3-ol) menurun pada suhu 60,8°C. Pengelupasan biji harus dihindari dalam pemrosesan mekanis karena sebagian besar proantosianidin ada di dalam mantel biji.

Hasil dari ekstraksi juga dipengaruhi oleh parameter lainnya seperti jenis pelarut yang digunakan. Sifat kepolaran suatu pelarut akan berpengaruh terhadap hasil senyawa yang terekstrak dari suatu bahan (Khopkar, 2003). Penelitian Xu *et al.*, (2010) mengekstraksi senyawa proantosianidin pada biji anggur menggunakan pelarut metanol: air: HCl (70: 29: 1), aseton: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan etanol: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) menghasilkan ekstrak proantosianidin 69,8 mg/g sampel, 60 mg/g sampel dan 38 mg/g sampel dengan waktu optimal selama 20 menit.

2.6. Kromatografi Lapis Tipis

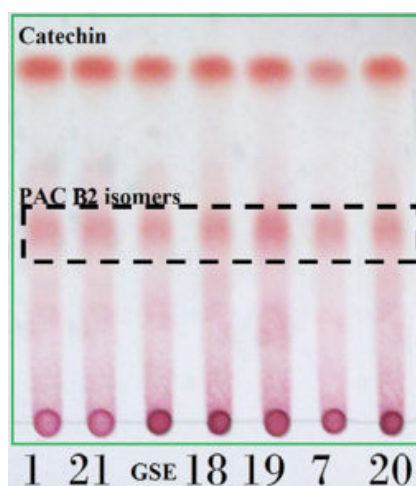
Kromatografi lapis tipis digunakan untuk identifikasi dan memperoleh profil kromatogram. Metode ini khas dan mudah dilakukan untuk zat dengan jumlah sedikit (Harborne, 1996). KLT merupakan metode pemisahan yang sederhana dengan peralatan yang minimal dan prosedur yang relatif cepat dan murah untuk berbagai campuran sampel. KLT menggunakan fase gerak dalam jumlah kecil sehingga lebih hemat waktu dan biaya analisis serta lebih ramah lingkungan (Wulandari, 2011). Posisi senyawa pada kromatogram dapat diketahui dengan menentukan nilai R_F , dengan nilai R_F antara 0 sampai 0,999. Nilai R_F dapat ditentukan melalui Persamaan 2.1 (Harborne, 1996).

$$R_F = \frac{\text{jarak tempuh senyawa terlarut}}{\text{jarak tempuh pelarut}} \dots\dots\dots(2.1)$$

Villani *et al.*, (2015) menganalisis proantosianidin melalui metode KLT dari beberapa sampel biji anggur menggunakan plat silika gel F₂₅₄ dengan eluen aseton: asam asetat: toluena (3: 1: 3). Eluen yang digunakan bersifat semi polar kearah nonpolar karena dilihat dari komposisi aseton yang bersifat semipolar dan toluen bersifat nonpolar dengan perbandingan jumlah yang sama. Proantosianidin yang bersifat polar cenderung berinteraksi dengan plat silika dan sedikit berinteraksi dengan eluen.

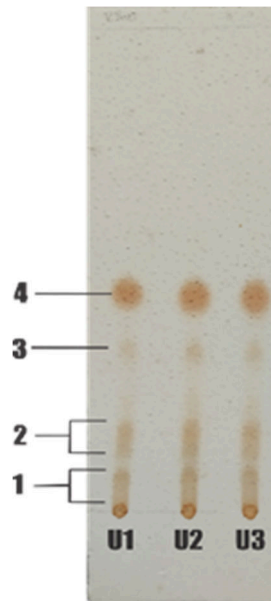
Hasil penelitian Villani *et al.*, (2015) menunjukkan pola pemisahan yang baik dengan bantuan visualisasi reagen vanillin-HCl, senyawa polifenol dapat teramati dengan terbentuknya noda merah muda. Senyawa proantosianidin B2 dan katekin yang berada pada biji anggur teramati pada R_F 0,35 dan 0,7 seperti pada

Gambar 2.4. Reaksi reagen vanillin-HCl dengan flavan-3-ol maupun proantosianidin membuat noda yang tampak menjadi berwarna merah (D'Mello, 1997).



Gambar 2.4. Visualisasi reagen vanillin-HCl senyawa proantosianidin B2 pada plat KLT beberapa sampel produk ekstrak biji anggur (Villani *et al.*, 2015)

Penelitian sebelumnya oleh Afrianto (2021) menganalisis pola pemisahan KLT pada ekstrak biji anggur bali dengan pelarut metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1). Eluen yang digunakan yaitu toluene: asam asetat: aseton (3: 1: 3) dan hasil noda divisualisasikan menggunakan reagen semprot vanillin-HCl. Hasil pemisahan menunjukkan terdapat 4 buah noda, dimana noda nomor 4 diduga merupakan senyawa proantosianidin yang muncul pada R_F sekitar 0,37-0,45. Hasil kromatogram KLT oleh Afrianto (2021) dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Pola pemisahan KLT ekstrak biji anggur bali dengan pelarut metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1)

2.7. Spektrofotometer UV-Vis

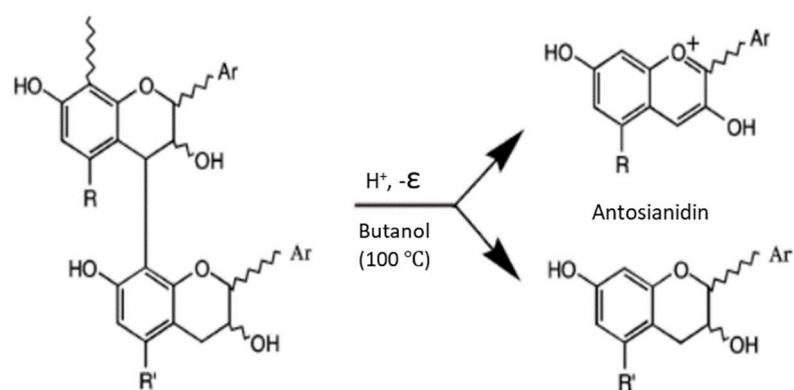
Metode spektrofotometri UV-Vis umumnya dipergunakan untuk penentuan senyawa dalam jumlah yang sangat kecil. Prinsip kerjanya didasarkan pada penyerapan cahaya atau energi radiasi elektromagnetik (foton) oleh suatu larutan. Jumlah energi radiasi (foton) yang diserap memungkinkan pengukuran jumlah zat penyerap dalam larutan secara kuantitatif. Metode spektrofotometri UV-Vis didasarkan pada hukum Lambert-Beer yang dinyatakan dalam Persamaan 2.2 di bawah ini (Triyanti, 1985).

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_t} \text{ atau } A = a \times b \times c \dots\dots\dots (2.2)$$

Keterangan: A = absorbansi
a = absorpsivitas
b = lebar kuvet
c = konsentrasi larutan

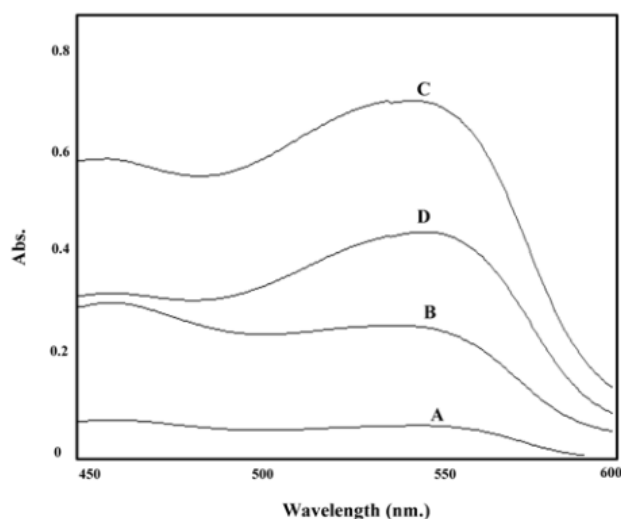
Metode analisis adanya kandungan senyawa proantosianidin dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Metodenya didasarkan pada depolimerisasi oksidatif proantosianidin, dengan panas dalam media asam mineral, dan pembentukan antosianin yang menyerap pada panjang gelombang 550 nm (Vivas *et al.*, 2006). Metode ini banyak digunakan untuk pengukuran tanin terkondensasi (proantosianidin) dalam makanan. Metode ini tidak berlaku untuk menentukan flavan-3-ol, yang merupakan monomer proantosianidin (Altiok, 2003).

Proantosianidin didepolimerisasi dalam lingkungan asam dengan pereaksi butanol dan Fe pada 100°C. Dalam kondisi ini, sampel proantosiadin yang didepolimerisasi menghasilkan antosianidin berwarna merah muda-kemerahan (Altiok, 2003). Ku dan Mun (2006) melaporkan bahwa Fe^{3+} merupakan ion logam transisi yang paling efisien dalam mengkatalisis pembentukan warna pada reaksi butanol-HCl. Reaksi butanol-HCl dengan proantosianidin dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Reaksi butanol-HCl dengan proantosianidin(Altiok, 2003)

Penelitian Lee *et al.*, (2009) mengidentifikasi adanya kandungan proantosianidin pada biji anggur liar. Hasil fraksi diperiksa menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 450-600 nm. Setelah direaksikan dengan metode butanol-HCl dan menghasilkan serapan puncak pada panjang gelombang sekitar 550 nm yang menunjukkan adanya senyawa proantosianidin oligomer. Spektra serapan proantosianidin dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7. Spektra serapan UV-Vis proantosianidin reaksi butanol-HCl dari hasil fraksi etanol 75% (A dan B) dan fraksi aseton 75% (C dan D) sampel biji anggur liar (Lee *et al.*, 2009)

2.8. Identifikasi FTIR Proantosianidin

Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy (FTIR) adalah metode analisis yang didasarkan pada vibrasi atom-atom dalam suatu molekul. Gelombang radiasi inframerah akan diadsorpsi suatu molekul apabila memiliki momen dipol listrik yang akan berubah selama vibrasi (Hudiyanti, 2018). Letak pita serapan pada spektrum FTIR suatu sampel dikaitkan dengan adanya suatu gugus fungsional

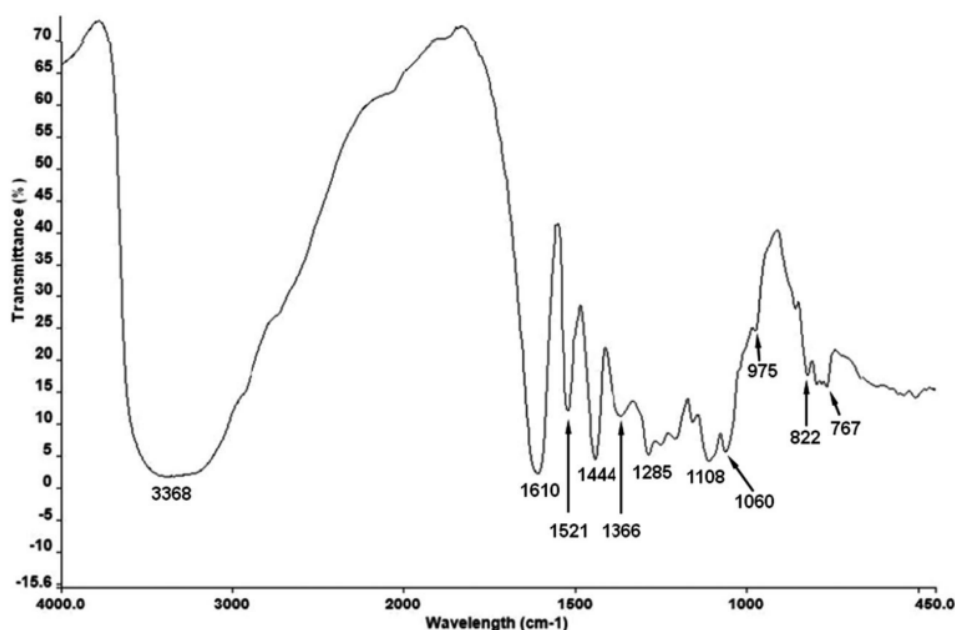
tertentu (Day dan Underwood, 1999). Daerah antara bilangan gelombang 4000 cm^{-1} hingga 400 cm^{-1} merupakan vibrasi yang informatif untuk tujuan elusidasi struktur (Gandjar dan Rohman, 2007).

Frekuensi vibrasi terkait karakteristik struktur proantosianidin dapat dilihat pada daerah antara $1540\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$. Pada daerah $1540\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan galokatekin yang berbeda dari katekin karena memiliki gugus hidroksil ekstra di cincin-B, hal ini dikaitkan dengan mode peregangan kerangka cincin aromatik. Spektrum turunan galokatekin atau prodelpinidin menunjukkan dua puncak yang berbeda pada daerah sekitar 1520 dan 1535 cm^{-1} , sementara hanya satu pita pada sekitar 1520 cm^{-1} yang diamati dalam spektrum katekin atau prosianidin (Foo, 1980).

Frekuensi vibrasi terkait karakteristik struktur proantosianidin yang lebih khusus lagi dapat dilihat pada daerah antara $780\text{-}730\text{ cm}^{-1}$. Pada daerah $780\text{-}730\text{ cm}^{-1}$ menandakan deformasi luar bidang atom hidrogen dari cincin aromatik yang menunjukkan adanya pola hidroksilasi cincin-B. Pita absorpsi di wilayah ini menyediakan cara untuk membedakan antara polimer prosianidin dan prodelpinidin, hal ini karena frekuensi deformasi lebih ditentukan oleh posisi daripada sifat substituen. Spektrum prosianidin lebih menonjol pada daerah $780\text{-}770\text{ cm}^{-1}$ sedangkan spektrum prodelpinidin terdapat pada daerah sekitar 730 cm^{-1} (Foo, 1980).

Ku dan Mun (2007) meneliti kandungan proantosianidin dari kalit kayu *Pinus radiata*. Pita absorpsi yang kuat pada $3,385$, $1,612$, dan $1,067\text{ cm}^{-1}$ dikaitkan dengan karakteristik kelompok fungsional poliflavonoid, sedangkan pada $1,522$ dan 777 cm^{-1} dikaitkan dengan mode pernapasan cincin aromatik dan CH deformasi

luar bidang dengan dua atom hidrogen bebas yang berdekatan yang menunjukkan adanya struktur prosianidin. Penelitian lain oleh Fu *et al.*, (2015) mengidentifikasi proantosianidin dengan FTIR menghasilkan puncak karakteristik pada daerah 1521 dan 767 cm^{-1} yang menandakan terdapatnya prosianidin di apel gajah (*Dillenia indica* Linn.). Spektra FTIR dari proantosianidin dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8. Spektra FTIR proantosianidin apel gajah (*Dillenia indica* Linn.) (Fu *et al.*, 2015)

2.9. Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Artemia salina Leach merupakan zooplankton dan tergolong sebagai udang primitif yang berukuran 1-2 cm. Dapat ditemukan pada air dengan salinitas yang tinggi dan tidak dapat hidup di air tawar. Hidup pada suhu antara 25-30°C, oksigen terlarut sekitar 3 mg/L, dan pH antara 7,3-8,4. *Artemia* diperjualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut kista (Hafidloh, 2014).

Artemia salina L. dapat hidup di lingkungan dengan kadar garam yang sangat tinggi dan luas (Gajardo dan Beardmore, 2012). Selain itu, *Artemia salina* memiliki kesamaan tanggapan dengan mamalia seperti tipe *DNA-dependent RNA-polymerase* (DNA yang mengarahkan proses transkripsi RNA) (Panjaitan, 2011).



Gambar 2.9. Larva *Artemia salina* Leach fase nauplii (Ates *et al.*, 2016)

Fase pertumbuhan *Artemia salina* yaitu kista, panggung payung, nauplii, remaja, dan dewasa (Gajardo dan Beardmore, 2012). Uji toksisitas menggunakan larva udang pada fase nauplii. Nauplii usia 48 jam merupakan usia yang paling sensitif untuk sebagian besar senyawa uji (Vanhaecke *et al.*, 1981). Gambar 2.9 menampilkan *Artemia salina* pada fase nauplii. Kematian *Artemia salina* L. merupakan parameter yang ditunjukkan saat suatu senyawa memiliki aktivitas biologi (Meyer *et al.*, 1982).

Senyawa uji bertindak sebagai racun perut yang dapat menghambat daya makan larva *Artemia salina* L. Senyawa uji menyerang sistem pencernaan larva sehingga mengganggu metabolisme dan menghambat reseptor perasa di mulut larva. Akibatnya larva tidak dapat mengenali makanannya karena gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga menyebabkan larva kelaparan dan akhirnya mati (Sadino, dkk., 2017).

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu uji pendahuluan untuk menentukan tingkat toksisitas suatu ekstrak menggunakan larva udang *Artemia salina* L. sebagai hewan uji karena sangat mirip dengan sel manusia (Oratmangun, dkk., 2014). Metode ini digunakan sebagai skrining terhadap senyawa aktif antikanker karena mudah, cepat, dan murah (Suzery dan Cahyono, 2014).

Toksisitas ekstrak dapat ditentukan dengan nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50*). Suatu senyawa kimia dapat dikatakan toksik apabila nilai $LC_{50} < 1000$ ppm. LC_{50} menunjukkan konsentrasi zat yang menyebabkan terjadinya kematian pada 50% hewan uji. Parameter nilai LC_{50} digunakan untuk mengetahui adanya potensi aktivitas sitotoksik suatu sampel. Parameter nilai LC_{50} ditunjukkan dalam Tabel 2.2 (Oratmangun, dkk., 2014).

Tabel 2.2. Parameter nilai LC_{50} aktivitas toksisitas ekstrak

LC_{50} (ppm)	Potensi
<30	Antitumor dan antikanker
30-200	Antimikroba
200-1000	Peptisida

Uji toksisitas memiliki korelasi dengan uji sitotoksik apabila mortalitas terhadap *Artemia salina* Leach yang ditimbulkan memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ $\mu\text{g/mL}$. Kategori tingkat toksisitas ditunjukkan pada Tabel 2.3 (Meyer, *et al.*, 1982).

Tabel 2.3. Kategori toksisitas ekstrak

LC_{50} (ppm)	Kategori
<30	Sangat toksik
30-1000	Toksik
>1000	Tidak toksik

Beberapa penelitian menguji toksisitas dari buah anggur dan membuktikan bahwa buah anggur memiliki aktivitas toksik. Penelitian Mutia (2010) menguji toksisitas dari ekstrak *soxhlet* buah anggur lokal menggunakan metode BSLT dengan waktu inkubasi selama 1 hari menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 648.004 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian lain oleh Atolani *et al.*, (2012) menguji toksisitas dari ekstrak *soxhlet* biji anggur lokal menggunakan metode BSLT dengan waktu inkubasi selama 1 hari menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 12,76 $\mu\text{g/mL}$.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada November 2020- Mei 2021 di Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Pisau dan alat penggiling dengan ayakan 90 mesh digunakan pada tahap preparasi sampel. Cawan penguap, desikator, spatula, neraca analitik, penjepit kayu, dan gelas arloji digunakan untuk analisis kadar air. Ekstraktor ultrasonik, seperangkat alat gelas, neraca analitik, corong buchner, pompa vakum, kertas saring dan *rotary evaporator vacuum* digunakan dalam proses ekstraksi dengan metode ultrasonik. Uji KLT menggunakan oven, *chamber*, pipa kapiler, dan alat penyemprot. Identifikasi senyawa proantosianidin menggunakan seperangkat instrumen UV-Vis dan FTIR.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji anggur bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavallee) dari perkebunan di Kabupaten Buleleng, Bali. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi ultrasonik yaitu metanol (p.a.), aseton (p.a.), asam klorida (p.a.) dan asam asetat (p.a.). Bahan uji kualitatif proantosianidin menggunakan larutan FeSO₄ 2% (b/v), butanol (p.a.), asam klorida (p.a.), dan

metanol (p.a.). Analisis KLT menggunakan aseton (p.a.), asam asetat (p.a.), toluen (p.a.), metanol (p.a.), dan vanillin. Uji toksisitas menggunakan air laut, DMSO, dan larva udang *Artemia salina* L.

3.3. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Analisis kadar air sampel
3. Ekstraksi senyawa aktif dengan metode ultrasonik
4. Pemisahan dengan KLTA dan KLTP
5. Identifikasi senyawa aktif proantosianidin pada ekstrak biji anggur dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR
6. Uji toksisitas metode BSLT
7. Analisis data

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Preparasi Sampel

Seratus gram biji anggur bali yang telah dipisahkan dari buahnya dicuci dengan air. Selanjutnya, biji anggur bali dikeringanginkan tanpa sinar matahari langsung pada suhu ruang. Setelah itu, dihaluskan sampel yang telah kering hingga menjadi serbuk dengan alat penggiling menggunakan ayakan 90 mesh. Serbuk kering biji anggur bali yang diperoleh digunakan sebagai sampel dalam penelitian.

3.4.2. Analisis Kadar Air

Metode gravimetri digunakan dalam analisis kadar air. Cawan porselen dipanaskan di dalam oven selama 1 jam pada suhu 105°C. Kemudian, disimpan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang. Selanjutnya, sebanyak 2 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan tersebut. Setelah itu, dipanaskan kembali di dalam oven selama 3 jam pada suhu 105°C. Kemudian, cawan + sampel kering disimpan di dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang. Perlakuan yang sama diulangi sampai tercapai berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan Persamaan 3.1 (AOAC, 1984).

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \dots\dots\dots (3.1)$$

Keterangan:

a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

3.4.3. Ekstraksi Senyawa Aktif Biji Anggur dengan Metode Ultrasonik

Sebanyak 10 gram serbuk biji anggur bali dimasukkan ke dalam 3 botol vial kaca. Kemudian, masing-masing botol vial ditambahkan pelarut 3 pelarut yang berbeda yaitu metanol: air: HCl (70: 29: 1), aseton: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan metanol: air: asam asetat (70: 29,9: 0,1) masing-masing sebanyak 100 mL. Ekstraksi dilakukan pada frekuensi 20 kHz selama 20 menit. Setelah itu, hasil ekstraksi yang diperoleh dipisahkan dengan corong buchner. Kemudian, dipekatkan filtrat hasil ekstraksi dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 50°C lalu ditimbang dan dihitung rendemennya dengan Persamaan 3.2.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots (3.2)$$

3.4.4. Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Plat silika gel F₂₅₄ digunakan sebagai fase diam dengan ukuran 5x10 cm. Setelah itu, diberi garis pada batas tepi bawah dengan jarak 1,5 cm untuk menentukan titik awal penotolan dan batas akhir elusi diberi garis pada tepi atas dengan jarak 0,5 cm. Kemudian, plat silika gel F₂₅₄ diaktivasi dengan cara dioven untuk menghilangkan kadar airnya pada suhu 100°C selama 5 menit. Selanjutnya, dilakukan penotolan sampel masing-masing sebanyak 5, 10 dan 15 totolan dan diberi jarak antar totolan 1 cm. Kemudian ditunggu hingga totolan kering.

Plat tersebut kemudian dielusi dengan eluen aseton: asam asetat: toluena (3: 1: 3) dalam bejana yang telah dijenuhkan selama 1 jam. Ketika eluen mencapai garis batas atas maka elusi dihentikan. Selanjutnya, dikeringanginkan plat dan disemprot dengan reagen vanillin-HCl (2,5 g vanilin dilarutkan dalam 50 mL HCl pekat). Selanjutnya, dihitung nilai *R_F* serta diamati noda yang terbentuk. Hasil penotolan terbaik dilakukan uji KLTA kembali dengan langkah yang sama menggunakan plat silika gel F₂₅₄ ukuran 2x10 cm.

3.4.5. Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Plat silika gel F₂₅₄ digunakan sebagai fase diam dengan ukuran 10x10 cm. Setelah itu, diberi garis pada batas tepi bawah dengan jarak 1,5 cm untuk menentukan titik awal penotolan dan batas akhir elusi diberi garis pada tepi atas dengan jarak 0,5 cm. Kemudian, plat silika gel F₂₅₄ diaktivasi dengan cara dioven

untuk menghilangkan kadar airnya pada suhu 100°C selama 5 menit. Selanjutnya, dilakukan penotolan sebanyak 5 totolan sepanjang garis batas bawah.

Plat tersebut kemudian dielusi dengan eluen aseton: asam asetat: toluena (3: 1: 3) dalam bejana yang telah dijenuhkan selama 1 jam. Ketika eluen mencapai garis batas atas maka elusi dihentikan. Kemudian, plat dikeringanginkan. Setelah itu, dihitung nilai R_F setiap noda yang terbentuk. Selanjutnya, dikerok noda dugaan senyawa proantosianidin lalu dilarutkan dengan metanol (p.a) dan disentrifugasi. Kemudian, diambil supernatan dan dikeringanginkan untuk identifikasi dengan FTIR dan UV-Vis

3.4.6. Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis (Vivas *et al*, 2006)

Metode yang digunakan adalah butanolisis dalam media hidroklorida dengan garam besi (FeSO_4) sebagai katalis. Sebanyak 2 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 ml metanol (p.a). Selanjutnya, dipipet sebanyak 1 ml larutan hasil isolat KLTP, 6 ml butanol: HCl (95: 5) dan 0,2 ml larutan FeSO_4 2% ditambahkan ke dalam tabung reaksi gelas (10 ml) dengan penutup. Tabung ditutup rapat, dikocok dan reaksi dibiarkan berkembang selama 40 menit dalam penangas air pada 95°C. Setelah itu, didinginkan dalam air es. Intensitas warna yang dikembangkan diukur pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Diulangi perlakuan diatas untuk hasil isolat KLTP.

3.4.7. Identifikasi dengan Spektrofotometer FTIR

Identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR dilakukan terhadap supernatan yang diperoleh dari hasil KLT preparatif. Supernatan kemudian

ditambahkan dengan padatan KBr, didiamkan, lalu campuran diletakkan di preparat dan ditekan menggunakan alat penekan, sehingga membentuk pelet. Selanjutnya, sampel diletakkan di *sample holder*, dibaca spektrum FTIR pada rentang bilangan gelombang 4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1} .

3.4.8. Uji Toksisitas Ekstrak Biji Anggur Bali terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

3.4.8.1. Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach (Hafiz, 2017)

Larva udang *Artemia salina* L. ditetaskan dengan cara dimasukkan 250 mL air laut ke dalam wadah penetasan. Setelah itu, dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* L. lalu diaerasi dan diberi pencahayaan selama ± 48 jam. Telur akan menetas dan larva udang siap untuk digunakan sebagai target uji toksisitas.

3.4.8.2. Uji Toksisitas Ekstrak Biji Anggur Bali

Larutan stok dibuat dengan melarutkan 10 mg ekstrak kasar ke dalam 100 mL pelarutnya untuk memperoleh konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya, dibuat 5 variasi konsentrasi, yaitu 10, 20, 30, 40 dan 50 $\mu\text{g/mL}$, kemudian dimasukkan ke botol vial untuk diuapkan pelarutnya. Setelah itu, dibuat larutan ragi dengan melarutkan 3 mg ragi dalam 5 mL air laut. Satu tetes larutan ragi ditambahkan 100 μL DMSO ke dalam vial berisi ekstrak, kemudian dikocok hingga larut sempurna. Sebanyak 10 ekor *Artemia salina* dimasukkan ke dalam vial dan ditambah air laut hingga volumenya 10 mL. Uji toksisitas dilakukan dalam 3 kali pengulangan untuk setiap konsentrasi. Setelah itu, disimpan vial di bawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati kematian larva udang. Kematian larva udang dalam larutan ekstrak dibandingkan dengan dua kontrol, yaitu kontrol pelarut dan kontrol DMSO.

Kontrol pelarut dibuat dengan mengambil 1 mL pelarut ke dalam vial dan diuapkan, ditambah dengan 100 µL DMSO, setetes larutan ragi roti dan 2 mL air laut kemudian dikocok. Selanjutnya, dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. ke vial, ditambah air laut hingga volumenya 10 mL. Setelah itu, disimpan vial di bawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati kematian larva udang.

Kontrol DMSO dibuat dengan memasukkan 100 µL DMSO ke vial. Kemudian, setetes larutan ragi roti, serta 10 ekor larva udang *Artemia salina* L dimasukkan ke vial dan ditambah air laut hingga volumenya menjadi 10 mL. Vial disimpan di bawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati kematian larva udang. Setelah itu, dihitung persen kematian larva dan kematian larva menggunakan Persamaan 3.3 dan Persamaan 3.4. Selanjutnya, data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis probit untuk mencari nilai LC₅₀ (Mawaddah, 2019).

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{Modus (jumlah larva yang mati)}}{\text{Jumlah larva uji (10 ekor)}} \times 100\% \dots \dots \dots (3.3)$$

$$\text{Mortalitas} = \% \text{Mortalitas} \times \text{Jumlah keseluruhan larva (50)} \dots \dots \dots (3.4)$$

3.4.8.3. Analisis Data

Hasil berupa data-data yang diperoleh dari hasil uji toksisitas dibuat dalam bentuk tabel. Selanjutnya, nilai LC₅₀ dicari menggunakan analisis data probit dengan aplikasi program Minitab 19.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Preparasi Sampel

Sampel biji anggur bali didapatkan dari perkebunan di Kabupaten Buleleng, Bali. Proses awal preparasi sampel yaitu pencucian untuk membersihkan kotoran yang menempel pada sampel, berat bersih sampel yang diperoleh yaitu sebanyak 250 gram. Proses selanjutnya yaitu pengeringan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang tanpa sinar matahari langsung yang berfungsi untuk mengurangi kandungan air dalam sampel. Perubahan warna dari hijau kecokelatan menjadi coklat terjadi pada sampel yang telah kering.

Sampel dihaluskan dengan menggunakan pengayak berukuran 90 mesh untuk menyeragamkan ukuran dan memperluas permukaan partikel sampel. Voight (1995) melaporkan bahwa semakin kecil ukuran partikel sampel maka semakin besar luas permukaannya yang dapat mempercepat proses ekstraksi, hal ini terjadi karena kontak antara sampel dengan pelarut akan semakin besar. Serbuk biji anggur bali kering diperoleh sebanyak 235 gram.

4.2. Ekstraksi Ultrasonik Biji Anggur Bali

Senyawa-senyawa aktif (diantaranya proantosianidin) dari dalam sampel dapat diambil oleh pelarut melalui ekstraksi ultrasonik. Ekstraksi dengan jenis alat *probe system* dilakukan pada frekuensi 20 kHz. Suhu yang dihasilkan selama 20 menit proses ekstraksi sebesar 56-58°C. Senyawa aktif seperti flavan-3-ol dan proantosianidin dalam sampel biji anggur bali tidak rusak pada suhu tersebut.

Senyawa flavan-3-ol terdegradasi pada suhu 60°C (Fuleki dan Ricardo, 2003) dan proantosianidin terdegradasi pada suhu 100-140,8°C (Larrauri *et al.*, 1997).

Penggunaan variasi pelarut metanol: air: HCl (70:29:1) (MAH), aseton: air: asam asetat (70:29,5:0,5) (AAA), dan metanol: air: asam asetat (70:29,9:0,1) (MAA) bertujuan untuk mencari pelarut optimum yang memiliki tingkat toksisitas tertinggi. Selain itu, penggunaan variasi pelarut tersebut juga bertujuan agar senyawa proantosianidin terekstrak lebih optimal dalam bentuk aglikonnya yang bersifat polar. Senyawa dalam sampel yang bersifat polar maupun nonpolar dapat terlarut dalam pelarut metanol ataupun aseton. Hal ini karena metanol memiliki gugus hidroksil dan aseton memiliki gugus keton yang bersifat polar, selain itu keduanya juga memiliki gugus alkil yang bersifat non polar. Penggunaan asam asetat dan HCl berfungsi untuk mempercepat pemutusan ikatan peptida glikosida antara senyawa glikon (gula) dan aglikon (bukan gula) (Anggraeni, 2014).

Filtrat yang diperoleh dari ketiga variasi pelarut tidak memiliki perbedaan intensitas warna yang dapat diamati secara kasat mata. Filtrat MAH dan MAA memiliki warna merah bata, sedangkan filtrat dari pelarut AAA memiliki warna merah bata keruh. Hasil filtrat dari ketiga variasi pelarut dapat diamati pada Gambar 4.1.

Ketiga filtrat tersebut kemudian dipekatkan dan diperoleh hasil akhir berupa ekstrak pekat berwarna coklat kehitaman. Berat ketiga ekstrak pekat tersebut kemudian ditimbang untuk mendapatkan persentase rendemennya. Hasil penimbangan dan presentase rendemen ketiga ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Ekstrak MAH memberikan hasil rendemen tertinggi diantara pelarut lainnya. Hasil ini dipengaruhi oleh asam yang digunakan yaitu HCl. Penelitian Xu

et al., (2010) melaporkan bahwa penambahan HCl memberikan rendemen hasil ekstraksi yang lebih tinggi daripada penambahan asam asetat, hal ini mungkin karena fakta bahwa HCl dapat menurunkan pH dan menghasilkan ekstraksi senyawa fenol tambahan. Pratiwi (2016) melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi HCl menyebabkan bertambahnya ion H^+ untuk membentuk ion *carbonium-oxonium* siklik yang menyebabkan ikatan glikosidik semakin mudah terputus.

4.3. Pemanfaatan Ekstrak Biji Anggur Bali dalam Perspektif Islam

Allah Swt. menurunkan al-Qur'an melalui Nabi Muhammad saw. untuk dijadikan petunjuk dan pedoman bagi umat manusia. Di dalam al-Qur'an terdapat banyak anjuran yang mengajak manusia untuk menghayati alam semesta dan segala isinya. Maka dari itu, sudah sepatutnya manusia sebagai makhluk ciptaan Allah Swt. yang dikaruniai akal untuk menggunakan akal pikirannya dalam melakukan observasi alam sehingga diperoleh penemuan baru yang selaras dengan al-Qur'an (Shihab, 2001), salah satunya dengan adanya penelitian mengenai ekstrak biji anggur bali ini.

Terdapat hikmah dan manfaat atas segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah Swt. Semua itu merupakan bukti keesaan, keagungan dan kekuasaan Allah Swt. Sebagaimana Allah Swt. berfirman dalam al-Qur'an surat Ali 'Imron ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: “Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka.” (QS. Ali’ Imran: 190-191).

Berdasarkan Tafsir al Azhar oleh Buya Hamka (2015) ayat tersebut menjelaskan bahwa seorang hamba diarahkan oleh Allah Swt. untuk merenungkan penciptaan alam, langit, dan bumi serta pergantian siang dan malam yang penuh dengan tanda-tanda kebesaran Allah Swt. Kemampuan seseorang dalam memahami hal tersebut akan menjadikannya ulul albab. Ulul albab adalah orang yang banyak berdzikir dan berpikir.

Menurut Ibnu Katsir, insan yang memiliki kemampuan pemikiran dan intelektualitas yang bersih dan sempurna sehingga dapat memahami hakikat sesuatu secara benar adalah insan yang ulul albab (Ar-Rifa’i dan Nasib, 1999). Dalam hal menjadi insan yang ulul albab, ayat di atas mendorong manusia untuk merenungkan penciptaan alam semesta beserta isinya. Manusia akan sadar akan kebesaran Allah Swt. dan dapat mengetahui bahwa segala sesuatu yang diciptakan-Nya tidak ada yang sia-sia tak terkecuali tumbuhan.

Biji anggur merupakan bagian dari tumbuhan anggur yang diciptakan Allah Swt. dengan berbagai manfaat di bidang farmakologi, di antaranya sebagai anti-diabetes (Montagut *et al.*, 2010), antioksidan (Pastrana-Bonilla *et al.*, 2003),

anti-kolesterol (Natella *et al.*, 2002), anti-inflamasi (Terra *et al.*, 2011), anti-penuaan (Balu *et al.*, 2006), antibakteri (Ghouila *et al.*, 2017), dan anti-tumor (Zhou dan Raffoul, 2012). Bioaktivitas biji anggur yang beragam menyebabkan bagian tumbuhan ini memiliki potensi untuk dijadikan sebagai obat. Nabi Muhammad saw. bersabda:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya: “Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, maka akan sembuhlah si penderita dengan izin Allah.” (HR. Muslim).

Hadits tersebut menjelaskan bahwa segala jenis penyakit pasti ada obatnya dan Allah Swt. akan menyembuhkan suatu penyakit asalkan ada usaha untuk mengatasi penyakit tersebut. Penelitian ini merupakan salah satu bentuk usaha kita untuk mengetahui potensi biji anggur sebagai obat. Allah Swt. berfirman dalam QS. al-Furqan (25) ayat 2:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ هَمِيمٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

Artinya: “Yang memiliki kerajaan langit dan Bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan Dia menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat.” (QS. Al-Furqan: 2)

Berdasarkan Tafsir Ibnu Katsir, ﴿وَلَقَدْ كُلُّ شَيْءٍ فَقْدَرَهُ قَدِيرًا﴾ memiliki arti segala sesuatu selain Dia (Allah) adalah makhluk (yang diciptakan) dan marbut

(yang berada di bawah kekuasaan-Nya). Dia-lah pencipta segala sesuatu, Rabb, Raja dan Ilah-Nya. Sedangkan segala sesuatu berada di bawah kekuasaan, aturan, tatanan, dan takdir-Nya (Ad-Damasyqi, 2004). Sebagaimana Allah Swt. menciptakan biji anggur bali dengan potensi sebagai antikanker dan antibakteri dengan kadar atau ukuran tertentu.

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa:

- a) Ekstrak yang memiliki toksisitas dengan kategori sangat kuat yaitu ekstrak MAH yang berpotensi sebagai antikanker dan antitumor.
- b) Identifikasi UV-Vis ekstrak biji anggur bali dengan pelarut MAH, AAA, dan MAA dengan metode *bate-smith* menandakan adanya senyawa proantosianidin pada semua variasi ekstrak.
- c) Isolat KLTP MAA pada R_F 0,42 diduga tidak terdapat senyawa proantosianidin.

5.2. Saran

Perlu dilakukan penambahan uji yaitu dengan pelarut aseton: air: HCl sehingga dapat diketahui efek dari penggunaan HCl terhadap nilai rendemen dan LC_{50} . Kemudian, perlu dilakukan uji bioaktivitas lebih lanjut terhadap ekstrak biji anggur bali dengan pelarut MAH karena bersifat sangat toksik dan berpotensi sebagai antitumor dan antikanker. Selanjutnya, diperlukan standar proantosianidin sehingga hasil noda KLT, hasil spektra UV-Vis dan FTIR dapat dibandingkan untuk mempermudah penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Ad-Damasyqi, A.F.I.I.K. 2004. *Tafsir Ibnu Katsir*, terjemahan M. Abdul Ghoffar E.M., Abdurrahim M., dan Abu Ihsan A. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Afrianto, K. R. A. Optimasi Metode Kestabilan Senyawa Proantosianidin Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Alphonso Lavalley) Didasarkan Jenis Pelarut dan Waktu Ekstraksi Ultrasonik pada Kromatografi Lapis Tipis [skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Altıok, E. 2003. Production of Proanthocyanidins from Grape Seed [tesis]. İzmir: İzmir Institute of Technology.
- Anggraeni, O. N., Fasya, A. G., dan Hanapi, A. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan N-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. *ALCHEMY*. (1), 173-188.
- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis Association of Official. *Agricultural Chemists*. 2: 771.
- Ar-Rifa'i, M., dan Nasib. 1999. *Ringkasan Tafsir Ibnu Katsir*. Jakarta: Gema Insani.
- Astawa, I. N. G., Mayadewi, N. N. A., Sukewijaya, I. M., Pradnyawathi, N. L. M., dan Dwiyan, R. 2015. Perbaikan Kualitas Buah Anggur bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavalley) melalui Aplikasi GA3 sebelum Bunga Mekar. *Agrotrop: Journal on Agriculture Science*. Volume 5, Nomor 1: 37-42.
- Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Camas, M., dan Celik, F. 2016. Toxicity of Engineered Nickel Oxide and Cobalt Oxide Nanoparticles to *Artemia salina* In Seawater. *Water, Air, & Soil Pollution*. 227(3), 70.
- Atolani, O., Omere, J., Otuechere, C. A., & Adewuyi, A. (2012). Antioxidant and Cytotoxicity Effects of Seed Oils From Edible Fruits. *Journal of Acute Disease*, 1(2), 130-134.
- Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., dan Panneerselvam, C. 2006. Modulatory Role of Grape Seed Extract on Age-Related Oxidative DNA Damage In Central Nervous System of Rats. *Brain Research Bulletin*. 68(6), 469–473.
- Budimarwanti, C dan Handayani, S. 2010. Efektivitas Katalis Asam Basa pada Sintesis 2-hidroksikalkon, Senyawa yang Berpotensi sebagai Zat Warna. *Prosiding seminar nasional Kimia dan Pendidikan Kimia 2010*. ISBN: 978-979-98117-7-6.

- Bukhari, S. B., Memon, S., Mahroof-Tahir, M., dan Bhanger, M. I. 2009. Synthesis, Characterization and Antioxidant Activity Copper–Quercetin Complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 71(5), 1901-1906.
- Cahyono, A.B. 2004. *Keselamatan Kerja Bahan Kimia di Industri*. Yogyakarta: UGM Press.
- D'Mello, J. P. 1997. *Handbook of Plants and Fungal Toxicants*. New York: CRC Press.
- Da Rocha *et al.* (2012). Grape pomace extracts as green corrosion inhibitors for carbon steel in hydrochloric acid solutions. *Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Dai, J., dan Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. Volume 15, Nomor 10.
- Day, R. A., dan Underwood, A. L. 1999. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Terjemahan oleh Iis S. 1999. Jakarta: Erlangga.
- Departemen Kesehatan RI. 1994. *Keputusan Menteri Kesehatan RI Nomer 661/MENKES/SK/VII/1994 tentang Persyaratan Obat Tradisional*. Jakarta: Depkes.
- Dinicola, S., Cucina, A., Antonacci, D., dan Bizzarri, M. 2014. Anticancer Effects of Grape Seed Extract on Human Cancers: A Review. *J Carcinog Mutagen S*. 8(5).
- El Rayess, Y., Barbar, R., Wilson, E. A., dan Bouajila, J. 2014. Analytical Methods for Wine Polyphenols Analysis and for Their Antioxidant Activity Evaluation. *Wine: Phenolic Composition, Classification and Health Benefits*. 71-101.
- Fernández, K., & Agosin, E. 2007. Quantitative Analysis of Red Wine Tannins Using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectrometry. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 55(18), 7294-7300.
- Fiume *et al.* 2014. Safety Assessment of *Vitis vinifera* (Grape)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 33(3), 48-83.
- Foo, L. Y. 1981. Proanthocyanidins: Gross Chemical Structures by Infrared Spectra. *Phytochemistry*. 20(6), 1397-1402.
- Fu, C., Yang, D., Peh, W. Y. E., Lai, S., Feng, X., dan Yang, H. 2015. Structure and Antioxidant Activities of Proanthocyanidins from Elephant Apple (*Dillenia indica* Linn.). *Journal of Food Science*. 80(10), C2191-C2199.

- Fuleki, T. dan Ricardo S. J. M. 2003. Effects of cultivar and Processing Method On The Contents of Catechins and Procyanidins In Grape Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(3), 640–646.
- Gajardo, G.M., dan Beardmore, J.A. 2012. The Brine Shrimp *Artemia*: Adapted to Critical Life Conditions. *Frontiers In Physiology*. 3(185): 1-8.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Ghouila, Z., Laurent, S., Boutry, S., Vander Elst, L., Nateche, F., Muller, R. N., dan Baaliouamer, A. 2017. Antioxidant, Antibacterial and Cell Toxicity Effects of Polyphenols Fromahmeur Bouamer Grape Seed Extracts. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 9(1), 392.
- Hafidloh, D. 2014. Sitotoksik Ekstrak Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L) dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya [skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Hafiz, M.N. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform, dan nHeksana *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle dari Danau Ranu Kab. Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach [skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Hamka. 2015. *Tafsir Al-Azhar, Jilid 1*. Jakarta: Gema Insani.
- Handaratri, A., dan Yuniati, Y. 2019. Kajian Ekstraksi Antosianin dari Buah Murbei dengan Metode Sonikasi dan Microwave. *Jurnal Ilmiah Teknik Sipil dan Teknik Kimia*. Volume 4, Nomor 1: 63-67.
- Handoko, D.S. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal SIGMA*. 9(1).
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan oleh Padmawinata K dan Soedira I. Bandung: Penerbit Institut Teknologi Bandung.
- Hudiyanti, Dwi. 2018. *Biosurfaktan: Fosfolipida*. Yogyakarta: Deepublish.
- Khopkar, S. M., dan Saptorahardjo, A. 2003. *Konsep dasar kimia analitik*. Jakarta: UI-Press.
- Ku, C. S., dan Mun, S. P. 2007. Characterization of Proanthocyanidin In Hot Water Extract Isolated from *Pinus Radiata* Bark. *Wood Science and Technology*. 41(3), 235.

- Kumar, Sanjeet., K. Jyotirmayee, dan Monalisa Sarangi. 2013. Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 18(1), 126-132.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P. dan Saura, C. F. 1997. Effect of Drying Temperature On The Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(4), 1390-1393.
- Lee, H. R., Bak, M. J., Jeong, W. S., Kim, Y. C., dan Chung, S. K. 2009. Antioxidant Properties of Proanthocyanidin Fraction Isolated from Wild Grape (*Vitis Amurensis*) Seed. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. Volume 52, Nomor 5: 539-544.
- Liu, S. X. dan White, E. 2012. Extraction and Characterization of Proanthocyanidins from Grape Seeds. *The Open Food Science Journal*. Volume 6: 5-11.
- Ma, Z. F., dan Zhang, H. 2017. Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. *Antioxidants*. Volume 6, Nomor 3: 71.
- Mawaddah. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata* [skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnarn, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. and Mc Laughlin, J. L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. Vol. 45: 31-34.
- Montagut *et al.* 2010. Oligomers of Grape-Seed Procyanidin Extract Activate the Insulin Receptor and Key Targets of The Insulin Signaling Pathway Differently From Insulin. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 21(6), 476-48.
- Mutia, D. 2010. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Buah Anggur (*Vitis vinifera*) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST) [skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Natella, F., Belelli, F., Gentili, V., Ursini, F., dan Scaccini, C. 2002. Grape Seed Proanthocyanidins Prevent Plasma Postprandial Oxidative Stress in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(26), 7720-7725.
- Nile, S. H., Kim, S. H., Ko, E. Y., dan Park, S. W. 2013. Polyphenolic Contents and Antioxidant Properties of Different Grape (*V. vinifera*, *V. labrusca*, and *V. hybrid*) Cultivars. *BioMed research international*.

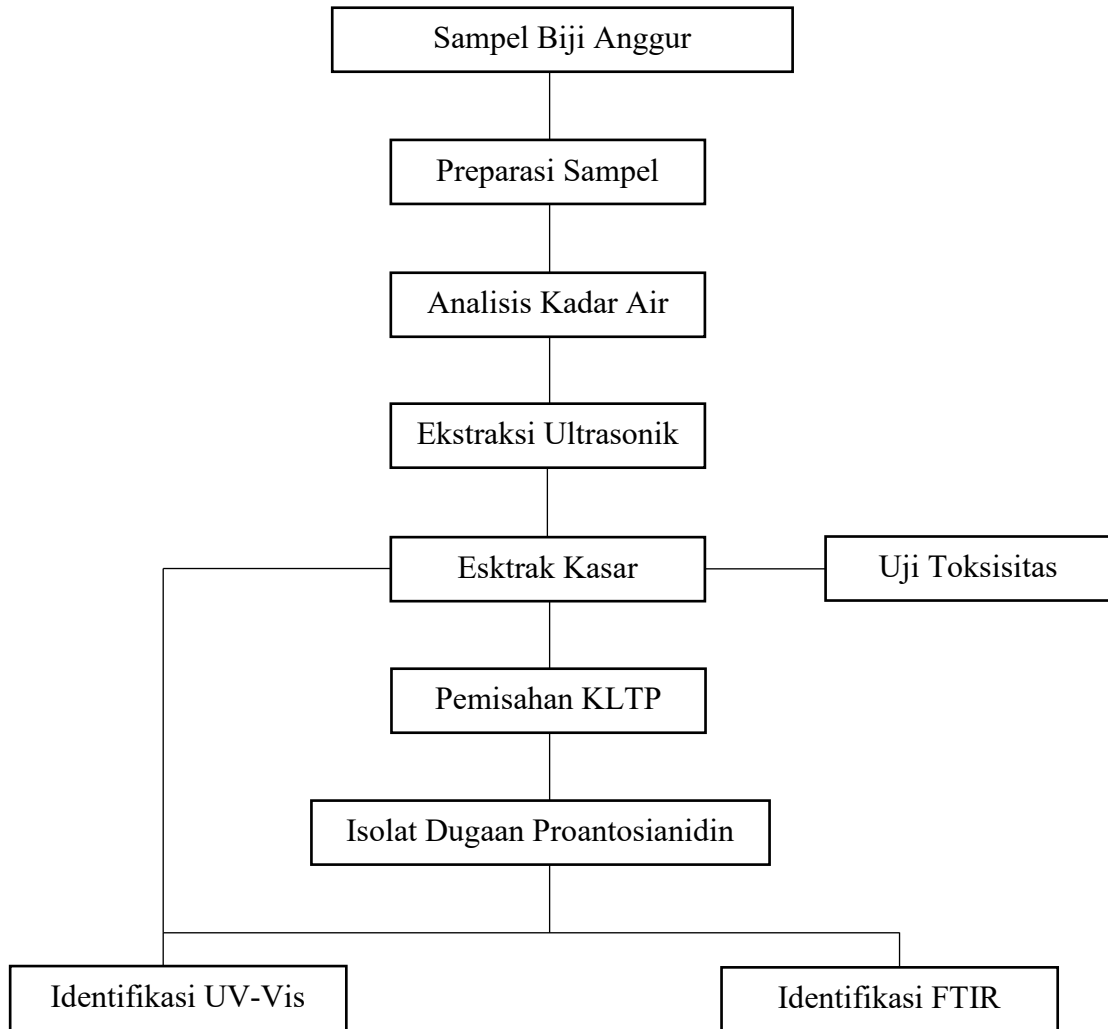
- Nugrahaningtyas, Khoirina Dwi., Sabirin Matsjeh, dan Tutik Dwi Wahyuni. 2005. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Rimpang Temu Ireng (*Curcuma aeruginosa* Roxb.). *Biofarmasi*. 3(1), 32-38.
- Oratmangun, S. A. 2014. Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) Terhadap *Artemia salina* dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Sebagai Studi Pendahuluan Potensi Anti Kanker. *PHARMACON*. 3(3).
- Panjaitan, R.B. 2011. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alixiaecortex*) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) [*skripsi*]. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C. C., Sellappan, S., dan Krewer, G. 2003. Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Muscadine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(18), 5497–5503.
- Porto, C. D, Porretto, E., dan Decorti, D. (2013). Comparison of Ultrasound-Assisted Extraction with Conventional Extraction Methods of Oil and Polyphenols from Grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. Volume 20, Nomor 4.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., dan Chan, B. G. 1985. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*. 25(1), 223-230.
- Pratiwi, I.F., 2016. Penentuan Kondisi Optimum pada Pembentukan Senyawaan-Asetil-D-Glukosamin Hasil Hidrolisis Kitin Non Enzimatis. *UNESA Journal of Chemistry*, 5(3).
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Radojčin, M., dan Dragović-Uzelac, V. 2016. Influence of Acidity and Extraction Time On The Recovery of Flavonoids from Grape Skin Pomace Optimized by Response Surface Methodology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 30(4), 455-464.
- Rukmana, Rahmat. 1999. *Anggur; Budidaya & Penanganan Pasca Panen*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sadino, A. Sahidin, I., dan Wahyuni, W. 2017. Acute Toxicity of Ethanol Extract of *Polygonum pulchrum* Blume Using Brine Shrimp Lethality Test Method. *Pharmacology and Clinical Pharmacy Research*. 2(2): 46-50.
- Samavardhana, K., Supawititpattana, P., Jittrepotch, N., Rojsuntornkitti, K. dan Kongbangkerd, T. 2015. Effects of Extracting Conditions on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Different Grape Processing by Products. *International Food Research Journal*. Volume 22, Nomor 3.

- Schofield, D., Mbugua D.M., dan Pell A.N.. 2001. Analysis of Condensed Tannins: a Riview. *Animal Feed Science and Technology*. 91(1), 21-40.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., dan Kakuda, Y. 2003. Polyphenolics in Grape Seeds-Biochemistry and Functionality. *Journal of Medicinal Food*. Volume 6, Nomor 4: 291–299.
- Shihab, M. Q. 2001. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shriner, T.L., Hermann, C.K.F., Morrill, T.C., Curtin, D.Y., dan Fuson, R.C. 2004. *The Systematic Identification of Organic Compounds, Eighth Edition*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Table and Chart Second Edition*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Soemirat, J. 2005. Toksikologi Lingkungan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Suzery, M., dan Cahyono, B. 2014. Evaluation of Cytotoxicity Effect of *Hyptis pectinata* Poit (*Lamiaceae*) Extracts Using BSLT and MTT Methods. *Jurnal sains dan matematika*. 22(3), 84-88.
- Terra *et al.* 2009. Grape-seed Procyanidins Prevent Low-Grade Inflammation by Modulating Cytokine Expression In Rats Fed a High-Fat Diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 20(3), 210–218.
- Torres, N. M., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., dan Pacheco, N. 2017. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*. Volume 7, Nomor 3: 47.
- Trifunski, S., Munteanu, M. F., Agotici, V., Pintea, S., dan Gligor, R. 2015. Determination of flavonoid and Polyphenol Compounds In *Viscum album* and *Allium sativum* Extracts. *International Current Pharmaceutical Journal*. 4(5), 382-385.
- Triyanti, E., 1985. *Spektrofotometri Ultra-Violet dan Sinar Tampak Serta Aplikasinya dalam Oseanologi*. Jakarta: LIPI.
- Ulfa, A. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kulit Dahan Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach [skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Unusan, N. 2020. Proanthocyanidins In Grape Seeds: An Updated Review of Their Health Benefits and Potential Uses in The Food Industry. *Journal of Functional Foods*. Volume 67.

- Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., dan Sorgeloos, P. 1981. Proposal for a Short Term Toxicity Test with *Artemia Nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 5: 382-387.
- Villani, T. S., Reichert, W., Ferruzzi, M. G., Pasinetti, G. M., Simon, J. E., dan Wu, Q. 2015. Chemical Investigation of Commercial Grape Seed Derived Products to Assess Quality and Detect Adulteration. *Food chemistry*. Volume 170: 271-280.
- Vivas, N., Nonier, M. F., Pianet, I., de Gaulejac, N. V., dan Fouquet, É. 2006. Proanthocyanidins from *Quercus Petraea* and *Q. Robur Heartwood*: Quantification and Structures. *Comptes Rendus Chimie*. Volume 9, Nomor 1: 120-126.
- Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi 5*. Yogyakarta: UGM Press.
- Winata, E. W. dan Yuniarta. 2015. Ekstraksi Antosianin Buah Murbei (*Morus alba* L.) Metode Ultrasonic Bath (Kajian Waktu dan Rasio Bahan: Pelarut). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Volume 3, Nomor 2: 773-783.
- Wiryanta, B.T.W. 2008. *Membuahkan anggur di dalam pot*. Edisi ke-7. Jakarta: PT Agronedia Pustaka.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. PT. Jember: Taman Kampus Presindo.
- Xu, C., Yali Z., Jun W., dan Jiang L. 2010. Extraction, Distribution and Characterisation of Phenolic Compounds and Oil in Grape Seeds. *Food Chemistry*.
- Yulistian, D.P., Utomo, E.P., Ulfa, S.M. dan Yusnawan, E., 2015. Studi pengaruh jenis pelarut terhadap hasil isolasi dan kadar senyawa fenolik dalam biji kacang tunggak (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) sebagai antioksidan. *Jurnal Ilmu Kimia Universitas Brawijaya*. 1(1), pp.pp-819.
- Zhou, K., dan Raffoul, J. 2012. Potential Anticancer Properties of Grape Antioxidants. *Journal of Oncology*.

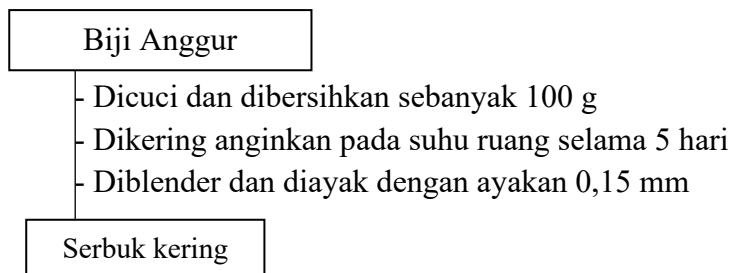
LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan Penelitian

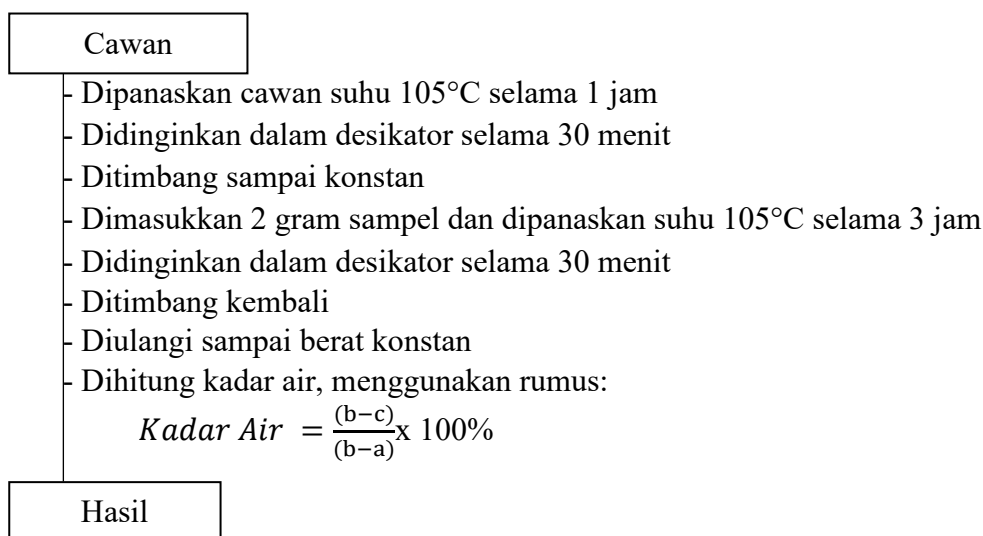


Lampiran 2. Skema Kerja

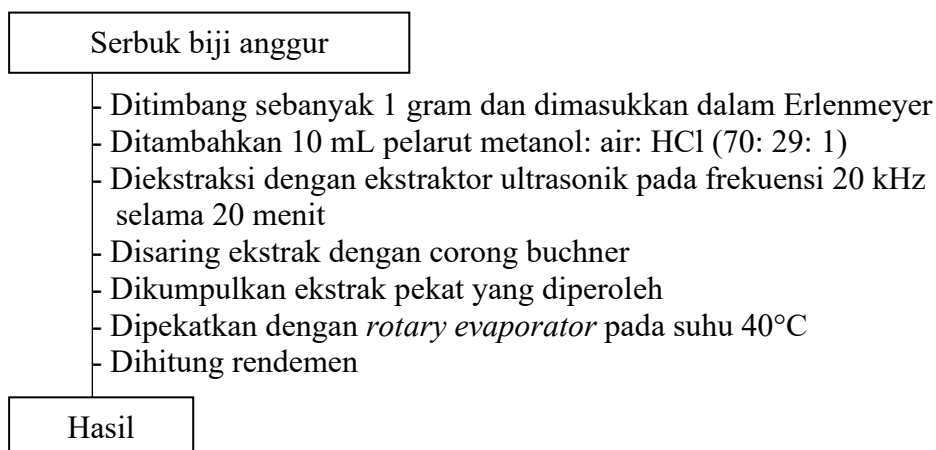
L2.1 Preparasi Sampel



L2.2 Analisis Kadar Air



L2.3 Ekstraksi Senyawa Aktif



Ket: Diulangi langkah di atas untuk pelarut aseton: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan metanol: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5)

L2.5 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTA dan KLTP

L2.5.1 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTA

Plat KLT G₆₀F₂₅₄

- Diberi penanda pada plat KLT ukuran 5 x 10 cm pada tepi bawah plat dengan jarak 1,5 cm sebagai posisi pentotalan
- Diberi penanda pada bagian tepi atas sepanjang 0,5 cm sebagai batas proses elusi
- Diaktivasi plat silika dengan di oven pada suhu 100°C selama 5 menit
- Diatur jarak antar totalan sepanjang 1 cm
- Ditotolkan ekstrak pada plat dengan variasi 5, 10, dan 15 totalan
- Ditunggu hingga totalan mengering
- Disiapkan eluen aseton: asam asetat: toluena (3: 1: 3) dalam bejana
- Dijenuhkan selama 1 jam
- Dielusi plat KLT hingga batas atas elusi
- Dikeluarkan plat dari bejana dan dikeringanginkan
- Disemprot dengan reagen vanillin-HCl
- Dihitung nilai R_F dan diamati noda yang terbentuk

Hasil

Ket: Diulangi langkah diatas pada hasil penotolan terbaik dengan ukuran plat KLT 2x10 cm.

L2.5.2 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTP

Plat KLT G₆₀F₂₅₄

- Diberi penanda pada plat KLT ukuran 10 x 10 cm pada tepi bawah plat dengan jarak 1,5 cm sebagai posisi pentotalan
- Diberi penanda pada bagian tepi atas sepanjang 0,5 cm sebagai batas proses elusi
- Diaktivasi plat silika dengan di oven pada suhu 100°C selama 5 menit
- Ditotolkan ekstrak pada plat sebanyak 5 totalan sepanjang garis batas bawah
- Dikeringanginkan
- Disiapkan eluen aseton: asam asetat: toluena (3: 1: 3) dalam bejana
- Dijenuhkan selama 1 jam
- Dielusi plat KLT hingga batas atas elusi
- Dikeluarkan plat dari bejana dan dikeringanginkan
- Dihitung nilai R_F dan diamati noda yang terbentuk
- Dikerok noda yang terbentuk yang merupakan dugaan senyawa proantosianidin
- Dilarutkan dalam metanol p.a dan disentrifugasi
- Diambil supernatan dan diuapkan

Isolat dugaan proantosianidin

L2.6 Uji Toksisitas

Ekstrak Kasar Biji Anggur Bali

- Ditimbang 10 mg
- Ditambahkan pelarut masing-masing sebanyak 100 mL untuk membuat larutan stok 100 ppm
- Dipipet larutan stok 100 ppm sebanyak 1, 2, 3, 4, dan 5 mL ke dalam botol vial
- Diuapkan pelarutnya hingga kering
- Ditambahkan 100 μ L dimetil sulfoksida (DMSO)
- Ditambahkan 1 tetes larutan ragi roti
- Ditambahkan 2 mL air laut dan dikocok hingga isolat larut
- Ditambahkan air laut hingga volumenya 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm
- Dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L.
- Dibiarkan selama 24 jam
- Dihitung kematian larva udang setelah 24 jam

Hasil

L2.7 Identifikasi Proantosianidin dengan UV-Vis

Isolat KLTP

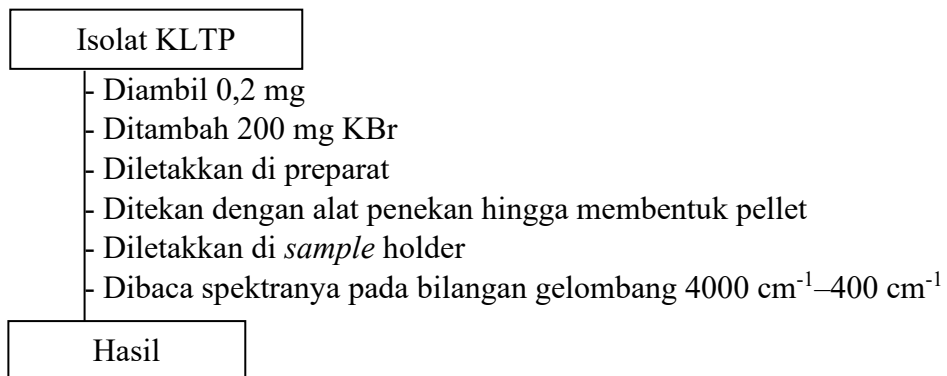
- Diambil 0,2 mg dan tuang dalam *beaker glass*
- Ditambahkan 5 mL metanol

Larutan sampel

- Diambil 1 mL
- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 6 mL larutan butanol/HCl (95: 5, v: v)
- Ditambahkan 0,2 mL larutan FeSO_4
- Ditutup rapat tabung reaksi
- Dikocok tabung
- Ditaruh dalam penangas air selama 40 menit pada suhu 95 °C
- Didinginkan dalam air es
- Diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm

Hasil

L2.8 Identifikasi Proantosianidin dengan FTIR



Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

L3.1 Pembuatan Larutan Metanol : Air : HCl (70:29:1) (MAH)

$$\begin{aligned}\text{Metanol} &= \frac{70}{100} \times 100 \text{ ml} = 70 \text{ mL} \\ \text{Air} &= \frac{29}{100} \times 100 \text{ ml} = 29 \text{ mL} \\ \text{HCl} &= \frac{1}{100} \times 100 \text{ ml} = 1 \text{ mL}\end{aligned}$$

Cara pembuatan: dipipet 70 mL metanol, dipipet 29 mL akuades dan dipipet 1 mL HCl, kemudian dimasukkan dalam wadah ekstrak yang berisi sampel.

L3.2 Pembuatan Larutan Aseton : Air : Asam asetat (70:29,5:0,5) (AAA)

$$\begin{aligned}\text{Aseton} &= \frac{70}{100} \times 100 \text{ ml} = 70 \text{ ml} \\ \text{Air} &= \frac{29,5}{100} \times 100 \text{ ml} = 29,5 \text{ ml} \\ \text{Asam asetat} &= \frac{0,5}{100} \times 100 \text{ ml} = 0,5 \text{ ml}\end{aligned}$$

Cara pembuatan: dipipet 70 mL aseton, dipipet 29,5 mL akuades dan dipipet 0,5 mL asam asetat, kemudian dimasukkan dalam wadah ekstrak yang berisi sampel.

L3.3 Pembuatan Larutan Metanol : Air : Asam asetat (70:29,9:0,1) (MAA)

$$\begin{aligned}\text{Aseton} &= \frac{70}{100} \times 100 \text{ ml} = 70 \text{ ml} \\ \text{Air} &= \frac{29,9}{100} \times 100 \text{ ml} = 29,9 \text{ ml} \\ \text{Asam asetat} &= \frac{0,1}{100} \times 100 \text{ ml} = 0,1 \text{ ml}\end{aligned}$$

Cara pembuatan: dipipet 70 mL metanol, dipipet 29,9 mL akuades dan dipipet 0,1 mL asam asetat, kemudian dimasukkan dalam wadah ekstrak yang berisi sampel.

L3.4 Pembuatan Larutan Pengembang Aseton: Asam asetat: Toluena (3:1:3)

$$\begin{aligned}\text{Aseton} &= \frac{3}{7} \times 7 \text{ ml} = 3 \text{ ml} \\ \text{Asam asetat} &= \frac{1}{7} \times 7 \text{ ml} = 1 \text{ ml}\end{aligned}$$

$$\text{Toluena} = \frac{3}{7} \times 7 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$$

Cara pembuatan: dipipet 3 mL aseton, dipipet 1 mL asam asetat dan dipipet 3 mL toluene, kemudian dimasukkan dalam chamber.

L3.5 Pembuatan Reagen Vanillin

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \frac{mg}{\text{volume (1000 ml)}} \\ \text{ppm} &= \frac{1000 \text{ mg}}{20 \text{ ml}} \\ \text{ppm} &= \frac{1000 \text{ mg}}{20 \text{ ml}} \times \frac{50}{50} \\ \text{ppm} &= \frac{50000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \\ &= \frac{50000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \\ \text{ppm} &= 50000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Cara pembuatan: ditimbang vanillin 1 gram, ditambahkan 20 mL HCl p.a.

L3.6 Pembuatan Larutan FeSO₄ 2% (b/v)

$$\begin{aligned} \text{Larutan FeSO}_4 \text{ 2 \%} &= \frac{2 \frac{\text{gr}}{\text{mL}}}{100} \times 50 \text{ mL} \\ &= 1 \text{ gram dalam 50 mL akuades} \end{aligned}$$

Cara pembuatan FeSO₄ 2% yaitu padatan FeSO₄ ditimbang sebanyak 1 gram. Setelah itu, dimasukkan ke dalam gelas beaker dan dilarutkan dengan akuades. Selanjutnya, dituangkan ke dalam labu ukur 50 mL. Kemudian ditanda bataskan dengan akuades dan dikocok hingga homogen.

L3.7 Pembuatan Larutan Stok 100 ppm untuk Uji Toksisitas

Volume labu ukur = 100 mL

ppm = µg/mL

M larutan stok = 100 ppm = 100 µg/mL

Massa ekstrak = 100 µg/mL x 100 mL

= 10.000 µg

= 10 mg

Jadi untuk pembuat larutan stok 100 ppm, dibutuhkan ekstrak sebanyak 10 mg, kemudian ditambahkan oleh pelarutnya hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L3.8 Pembuatan Larutan Uji Toksisitas Konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm

- **10 ppm**

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan uji 10 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 1 mL.

Tabel L.3.1. Pembuatan larutan uji toksisitas konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm

Konsentrasi (ppm)	Volume yang diambil dari larutan stok 100 ppm (mL)
10	1
20	2
30	3
40	4
50	5